

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie,
Fachrichtung Lebensmittelhygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Vergleichende Untersuchungen
über die Eignung der Fernsehbildanalyse
zum quantitativen Knochennachweis
in Fleischerzeugnissen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rainer Königsmann
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1978
Journal-Nr. 944

Kollegium für Lebenswissenschaften
– Fachklinik und -technologie,
Fachbereich 2, Medizinische Fakultät
des Fachbereichs Vorkursmedizin
der Freien Universität Berlin

Vergleichende Untersuchungen

über die Eignung der Fernsehbildanalyse
zum quantitativen Knochennachweis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

ausgewählter Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rainer Königsmann
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1978

Journal-Nr. 344

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie,
Fachrichtung Lebensmittelhygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vergleichende Untersuchungen über die Eignung der Fernsehbildanalyse zum quantitativen Knochennachweis in Fleischerzeugnissen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rainer Königsmann

Tierarzt aus Berlin

Berlin 1978
Journal-Nr. 944

Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Vorsitzender des FBR: Prof. Dr. H.-H. Frey
Referent: Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent: Prof. Dr. G. Böhme



Tag der Promotion: 20. Oktober 1978

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		<u>Seite</u>
1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1.	Ökonomische Gründe zur maschinellen Gewinnung von Restfleisch	2
2.2.	Verfahren zur maschinellen Gewinnung von Restfleisch	2
2.3.	Mikrobielle Beschaffenheit von maschinell entbeintem Fleisch	7
2.4.	Chemische und gewebliche Zusammensetzung von maschinell entbeintem Fleisch	9
2.5.	Verwendungsmöglichkeiten von maschinell entbeintem Fleisch	15
2.6.	Zur lebensmittelrechtlichen Situation bei der Verarbeitung von Restfleisch	18
2.7.	Nachweis von Knochen in Lebensmitteln	22
2.7.1.	Direkter Knochennachweis	22
2.7.1.1.	Sedimentationsmethoden	22
2.7.1.2.	Enzymatische Verdauung	23
2.7.1.3.	Laugenbehandlung	23
2.7.1.4.	Histologischer Knochennachweis	24
2.7.1.5.	Röntgenologischer Knochennachweis	25
2.7.2.	Indirekter Knochennachweis	25

	<u>Seite</u>
2.7.2.1. Calciumbestimmung	27
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	30
3.1. Material	30
3.2. Methodik	31
3.2.1. Calciumanalyse	31
3.2.1.1. Reagentien	31
3.2.1.2. Probenaufbereitung	31
3.2.1.3. Eingabe der Probe und Durchföhrung der Messung	32
3.2.1.4. Eichung	32
3.2.1.5. Berechnung	32
3.2.2. KOH-Auskochverfahren	33
3.2.2.1. Probenaufbereitung	33
3.2.2.2. Berechnung des Knochengehaltes	33
3.2.3. Histometrische Untersuchungen	34
3.2.3.1. Reagentien und Rezepturen	34
3.2.3.2. Probenaufbereitung	34
3.2.3.3. Meßvorgang	35
3.2.3.4. Probenauswahl	37
3.3. Betrachtungen zur histologischen Methodik	37
4. ERGEBNISSE	42
4.1. Ermittlung des Knochengehaltes mittels Atomabsorptionsspektrophotometrie und KOH-Auskochverfahren	42

		<u>Seite</u>
4.2.	Histometrische Knochenbestimmung mit Hilfe der Fernseh- bildanalyse	43
4.3.	Vergleich zwischen den chemi- schen Verfahren und der histo- metrischen Technik	45
4.4.	Ergebnistabellen und Abbildungen	48
5.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	71
5.1.	Atomabsorptionsspektralphoto- metrie (AAS)	71
5.2.	KOH-Auskochverfahren	73
5.3.	Fernsehbildanalyse	75
5.4.	Gegenüberstellung der Ergeb- nisse	82
6.	ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	85
7.	LITERATURVERZEICHNIS	91

1. EINLEITUNG

Die steigenden Personalkosten in der Fleischwareindustrie veranlaßten viele Betriebe, bestimmte Arbeitsgänge als unrentabel zu erachten und aufgrund der ungünstigen Zeit-Kosten Relation einzustellen. Das Nachputzen von Knochen nach dem Entbeinen der Schlachttierkörper ist besonders kostenaufwendig und wird häufig nicht mehr durchgeführt. Um den von Spezies zu Spezies variierenden Restfleischgehalt für den Produktionsprozeß nicht gänzlich zu verlieren, mußte die manuelle Tätigkeit durch ein automatisches Verfahren ersetzt werden. Hierzu entwickelte die technologische Forschung in den letzten zwei Jahrzehnten Separationsmaschinen, die mit unterschiedlichen Verfahrensweisen und Wirkungsgraden Fleischreste vom Knochen trennen. Trotz aller Bemühungen kann häufig das durch Separierung gewonnene Produkt noch nicht mit dem handwerksüblichen Putzfleisch verglichen werden.

Auch in der Bundesrepublik Deutschland kamen derartige Geräte bereits zum Einsatz. Es fehlen bisher gesetzliche Vorschriften zur Überwachung der Herstellung und Verarbeitung des Rohmaterials. Eine entsprechende Regelung erscheint deshalb erschwert, weil einerseits die Zusammensetzung des Separatorenfleisches je nach Herstellungsmethodik außerordentlich schwankt, und zum anderen keine einheitliche Auffassung über die Analysemethoden zur Ermittlung der wertmindernden Bestandteile, wie des Knochens, besteht.

Diese Arbeit befaßte sich mit dem Nachweis des wertmindernden Knochenanteils im Separatorenfleisch sowie den daraus hergestellten Produkten. Den Schwerpunkt bildete ein Vergleich von Methoden, mit denen der Knochengehalt direkt oder indirekt bestimmt werden kann.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Ökonomische Gründe zur maschinellen Gewinnung von Restfleisch

Neben dem Personalkostenfaktor, der eine rentable Gewinnung des Polkfleisches verhinderte, bildete die möglichst vollständige Ausnutzung des bei der Schlachtung anfallenden Fleisches einen weiteren Beweggrund zur Entwicklung automatischer Entbeinungsgeräte. Immerhin blieben bei den handwerksüblichen Zerlegungsmethoden ungefähr 5 % des Gesamtfleisches als Restfleisch an den Knochen haften (WIRTH, 1973).

So konnten bei Hähnchen ca. 33 % und bei Truthähnen ca. 28 % des Schlachttierkörpers mit anhaftendem Fleisch nur in der Futtermittelindustrie verarbeitet werden, da sich eine manuelle Gewinnung des Restfleisches nicht durchführen ließ. Damit gingen der menschlichen Ernährung große Proteinreserven verloren. Hierdurch wurde auch die besondere Stellung dieses Lebensmittelindustriezweiges auf dem Sektor der maschinellen Entbeinung deutlich (WIESE, 1976). Die maschinelle Restfleischgewinnung könnte der menschlichen Ernährung ca. 1 Milliarde Pfund Fleisch zusätzlich zur Verfügung stellen (FRIED, 1976). Trotz manuellen Schierens verliert ein Betrieb noch 1 Tonne Eiweiß je 100 Tonnen Fleischknochen (PFEIFFER, 1975).

2.2. Verfahren zur maschinellen Gewinnung von Restfleisch

Die Entwicklung von Geräten zur maschinellen Entbeinung von fleischtragenden Knochen begann Ende der fünfziger und Anfang der sechziger Jahre in den USA. Zunächst sollten diese Apparate eine erhöhte Fleischausbeute bei der Aufbereitung von Schlachtgeflügel ermöglichen (FRONING, 1976).

Auch in Osteuropa wurden Experimente zur maschinellen Trennung von Fleisch und Knochen mit Hilfe von Zentrifugen und Fräsen durchgeführt (SKRYPNIK, 1961). Bei diesen Versuchen stellte sich ein Erfolg erst ein, als der unterschiedliche Flüssigkeitsgehalt beider Komponenten genutzt wurde, um sie durch mechanischen Druck zu separieren. Mit einer hydraulischen Kolbenpreßvorrichtung beginnend, schlossen sich im weiteren Verlauf kontinuierlich arbeitende Schneckenpressen an. Beide Verfahrenstechniken spiegeln sich noch heute in den gebräuchlichen Separatoren wider.

Entsprechend verschiedener Trennprinzipien führte WIESE (1976) in seinem Übersichtsreferat folgende Methoden der maschinellen Entbeinung auf:

1. Abschießen des Fleisches mit CO_2 im festen Aggregatzustand.
2. Separieren durch rotierende Schneideelemente.
3. Trennen durch mechanisches Abpressen des Fleisches.
4. Trennen durch Abpressen unter hohem Druck im Labyrinthverfahren.
5. Gewinnen eines flüssigen Fleischhomogenates nach Vorzerkleinerung, Hydratation und Sedimentation.
6. Separieren durch Flotation.

Von diesen sechs Verfahren werden im Routinebetrieb hauptsächlich die unter Nr. 3-5 genannten Techniken eingesetzt. Unabhängig vom physikalischen Prinzip kann folgende Unterscheidung hinsichtlich der verwendeten Apparate getroffen werden:

1. Zur Abtrennung von Sehnen und Fett von bindegewebsreichem, vorgewolftem Fleisch werden Weichseparatoren benutzt.
2. Hartseparatoren werden zur maschinellen Gewinnung fleischtragender Knochen verwendet.

THIEMIG (1972) unterteilte die automatischen Entbeinungsmöglichkeiten genauso wie WIESE. Eingehend be-

schrieb er das Abschießen des Fleisches mittels CO_2 . Dabei wird das Ausgangsmaterial auf einem Stahlsieb-förderer an fest installierten Düsen vorbeigeführt, die durch Beschießen mit Trockeneis das Fleisch vom Knochen trennen. Die Weichteile fallen durch die Maschinen des Stahlsiebförderers, während die Knochen abtransportiert werden. Stahlkugeln und Eisstücke wurden hinsichtlich ihrer Eignung bei diesem Entfleischungsverfahren überprüft.

Die Entbeinung durch Flotation läßt sich bei gegartem Geflügel mit Hilfe zweier unterschiedlich eingestellter Salzlösungen erreichen. Nach ihrem spezifischen Gewicht werden Knochen, Haut und Fleisch voneinander getrennt. Beide Methoden wurden in Modellversuchen erprobt, jedoch nicht routinemäßig durchgeführt.

Bei der maschinellen Restfleischgewinnung mittels automatischer Apparaturen sind die kontinuierliche und die diskontinuierliche Restfleischgewinnung zu unterscheiden. Kontinuierlich arbeitende Separatoren, wie das Gerät der Firma PAOLI, benötigen generell vorzerkleinertes Material. Das gewolfte Fleisch/Knochen-Gemisch wird dem rotierenden Entknochungszyylinder (Walzenseparator) über eine spitzwinklig zur Oberfläche des Zylinders stehende Druckplatte von außen zugeführt. Durch die feinen Schlitzte in der Walze gelangt das abgepreßte Weichmaterial in das Innere des Zylinders und wird dort mit Hilfe einer Schnecke in das Vorratsgefäß transportiert. Die Knochenpartikel des Gemenges bleiben ebenso wie ein Teil der bindegewebigen Strukturen ausserhalb der Trommel (WITTMANN, 1977).

Im Gegensatz dazu bedienen sich andere kontinuierliche Verfahren eines feststehenden perforierten Zylinders, in den das vorzerkleinerte Trenngut automatisch eingefüllt wird. Die Firma BEEHIVE (N. N., 1976 a) versah

das Innere des Zylinders mit einer verdichtenden Schneckenwelle, die den Inhalt durch Staudruck in einen Entknohungskopf preßt. Während das weichere vom Knochen getrennte Material den Zylinder durch perforierte Öffnungen verläßt, wird die zurückbleibende Knochen-Bindegewebssubstanz automatisch am Entknohungskopf ausgeschieden.

Die Firma PRINCE ersetzte in dem von ihr entwickelten Gerät die Schneckenwelle durch eine Messerwelle. Bei diskontinuierlich arbeitenden Geräten wirkt über einen Kolben zusätzlicher Druck auf das zu trennende Fleisch/Knochen-Gemisch ein, so daß die weichen Gewebe durch Filtersätze bzw. über konzentrisch angeordnete Ringe (KARTRIDGE PAK, Selo[®]) nach außen abgepreßt werden. Nach abgeschlossenem Trennvorgang läßt sich das zurückbleibende Knochenmaterial im geformten Zustand beseitigen und das Gerät erneut mit Trenngut beschicken (REUTER, 1977; TÄNDLER, 1977).

Im Gegensatz zur KP-Anlage der Firma THE KARTRIDGE PAK Co. können die Apparate der Firma SEFELAAR u. LOOYEN (N. N., 1976 c) auch unzerkleinerte Knochen mit anhaftendem Fleisch verarbeiten.

Bei einem weiteren diskontinuierlichen Verfahren werden grobentbeinte "platte und breite" Knochen abgeflammt und dann mit einem Knochenbrecher in ca. 5 cm große Stücke zerschlagen. Dieses so vorbehandelte Material wird einem Zylinder mit Labyrinthsystem zugeführt und einem Preßdruck von 240-260 bar unterworfen. Das vom Knochen befreite Separat gelangt über den Deckel- bzw. Bodenteil des Zylinders nach außen (NEUHÄUSER, 1977).

Beim kontinuierlichen und auch beim diskontinuierlichen Abpressen tritt eine erhebliche Erwärmung der Fleischmasse ein. Hieraus resultiert eine Verschlechterung des hygienischen Status und der substantiellen Beschaffen-

heit, welche die Lagerfähigkeit und Verwertbarkeit des Separatorenfleisches stark einschränkt.

Um die nachteilige Erwärmung zu vermeiden, empfahl WINTER (1977) den Einsatz von CO_2 während des Produktionsprozesses. Es kann im Gemisch mit Scherbeneis dem vorge-schroteten Material zugesetzt oder dem fertigen Separat untergemischt werden. Bei den Geräten der Firma PAOLI verhindert das Einleiten von CO_2 in die Entknochungs-trommel eine Wärmebildung weitgehend. PRINCE schaltete der Anlage einen getrennten CO_2 -Kühler nach. Ebenso verfahren die Firmen BEEHIVE und THE KATRIDGE PAK (N. N. 1976 b).

Der Temperaturanstieg während des Bearbeitungsvorganges zeigt eine Abhängigkeit zum entstehenden Druck im Zylinder und kann deshalb auch über die Zufuhr des zu bear-beitenden Gemenges reguliert werden (WITTMANN, 1977).

Nach ähnlichen Trennprinzipien funktionieren Maschinen, die speziell zum Separieren von Sehnen und Kollagen aus einem reinen Fleischgemenge dienen. Derartige Weichseparatoren werden von der Firma BAADER angeboten (WIRTH, 1974). Im Gegensatz zu den PAOLI-Separatoren, die sich nur als Entknochungsanlagen eignen, finden die BEEHIVE-Geräte auch als Weichseparatoren Verwendung.

Von den bisher genannten Verfahren der mechanisch-ma-schinellen Fleischgewinnung unterscheidet sich ein in der Bundesrepublik Deutschland entwickeltes und paten-tiertes Verfahren der HERTA KG. Bei dieser Technik wer-den Knochen mit anhaftendem Fleisch zerkleinert, unter Zusatz von Eis und Nitritpökelsalz zu einem flüssigen Homogenat aufgeschwemmt und durch Zentrifugieren im Dekanter getrennt. Dabei scheiden sich die unterschied-lichen Gewebsstrukturen des Ausgangsmaterials in eine flüssige und eine feste Phase. Fett, Bindegewebe, Knor-pel und Knochen bilden das feste Sediment. Neben ge-

ringen Anteilen der wertmindernden Strukturen enthält die flüssige Phase überwiegend gelöstes Muskeleiweiß (PFEIFFER, 1975).

Eine bisher noch nicht praxisreife Methode der enzymatischen Entfleischung beschrieb OELKER (1972). Dabei wird die bindegewebige Verbindung zwischen Muskulatur und Knochen mit Hilfe proteolytischer Enzyme aufgelöst. Kollagenasen, Elastasen und teilweise auch Kollagenmukoproteinasen besitzen eine ausreichende Spezifität, um eine Trennung der Weichteile vom Knochen zu erreichen. Im Anschluß an die fermentative Behandlung bedarf es nur noch eines geringen mechanischen Aufwandes, um das Fleisch vollständig vom Knochen zu trennen. Besondere Vorteile soll dieses noch in der Entwicklung befindliche Verfahren für die Gewinnung großer Fleischstücke besitzen, während alle anderen Methoden überwiegend brätartige Produkte hervorbringen.

Abschließend seien Entfleischungsversuche erwähnt, bei denen Fleisch/Knochen-Homogenate in verschiedenen eingestellten Salzlösungen mit Ultraschall behandelt wurden. Die Ergebnisse sprachen jedoch vorerst gegen eine forcierte Weiterentwicklung dieser Methodik (PFEIFFER, 1975).

2.3. Mikrobielle Beschaffenheit von maschinell entbeintem Fleisch

Da die manuelle Gewinnung von Restfleisch (Knochenputz, Polkfleisch) durch intensives Bearbeiten mit Ziehklängen und "Wizzardmessern" bei Raumtemperatur ein erhebliches Risiko in sich birgt, versprach die maschinelle Entbeinung der fleischtragenden Knochen eine Verbesserung des mikrobiologischen Status (PFEIFFER, 1976). Die hygienische Gefährdung des manuell entbeinten Fleisches liegt hauptsächlich in einer sekundären Kontamination durch das Personal. Die Labilität erklärt sich

insbesondere aus dem starken Zerkleinerungsgrad und der daraus resultierenden Oberflächenvergrößerung des Gutes. Hinzu kommt eine durch den langen manuellen Arbeitsprozeß bedingte Erwärmung des Fleisches. Untersuchungen an Homogenat- und Knochenputzproben erbrachten ein deutlich geringeres Wachstum gramnegativer Keime in flüssigen Fleischhomogenaten, denen bei der maschinellen Gewinnung Nitritpökelsalz zugesetzt worden war. Insgesamt zeigte allerdings die Keimflora eine ähnliche Entwicklung wie im manuell erzeugten Knochenputz (LINKE et al., 1974).

WIESE (1976) verglich die bakterielle Kontamination im Putzfleisch mit der bei Hackfleischherstellung auftretenden Keimbesiedlung. Die Keimvermehrung im Separatorenfleisch wird wesentlich von der Temperatur des Ausgangsmaterials beeinflusst. Deshalb sollten aus dem Schlachttierkörper herausgelöste fleischtragende Knochen sofort der Separierung zugeführt oder gefrostet werden, da der Bearbeitungszeitpunkt in starker Abhängigkeit zur Gesamtkeimzahl steht, und eine verzögerte Weiterbehandlung der Fleischknochen den Keimgehalt der Probe beträchtlich erhöht.

Bei sorgfältiger Auswahl und Aufbewahrung des zu separierenden Ausgangsmaterials ist der hygienische Status von maschinell erzeugtem Restfleisch nicht schlechter als bei handentbeintem Fleisch (FIELD, 1976).

OSTOVAR et al. (1971) hielten maschinell entbeintes Geflügelfleisch hinsichtlich der Keimbesiedlung für gleichwertig mit anderen rohen Geflügelprodukten.

Einen Zusammenhang zwischen der Auswahl der Schlachttierkörperteile und dem zu erwartenden Keimgehalt wiesen KNORR et al. (1974) bei eigenen Separierungsversuchen nach. So besaß maschinell gewonnenes Restfleisch aus Schweinerippen bzw. Rinderköpfen eine Gesamtkeim-

zahl von $1,2 \times 10^5/\text{g}$ bzw. $2,4 \times 10^6/\text{g}$, hingegen erreichte das Separat aus Schweineköpfen und Schweineschwänzen Werte von $3 \times 10^7/\text{g}$ und $1,5 \times 10^7/\text{g}$.

Zur besseren Synopsis ist die Vielzahl der verschiedenen Untersuchungsergebnisse in Tabelle 1 (S. 10) zusammengestellt.

2.4. Chemische und gewebliche Zusammensetzung von maschinell entbeintem Fleisch

Die Ausbeute eines Separierungsprozesses wurde als Verhältnis zwischen dem Gewicht des gewonnenen Fleisches und dem des Fleisches samt Knochen definiert (FIELD et al., 1974 a). Bei Erhöhung der Ausbeute nimmt der Knochen- bzw. Calciumgehalt und der Fettgehalt im Separatorfleisch zu, bei Erniedrigung des Wasseranteils. Ein offensichtlicher Unterschied besteht im Ca-Anteil von Geflügelrestfleisch (mechanically deboned poultry meat = MDPM) einerseits sowie den Separaten von Huf- und Klauentieren (mechanically deboned red meat) andererseits. ARNETH et al. (1975) fanden im Geflügelfleisch einen geringeren Knochenanteil als in Proben von Rind und Schwein. Der Knochenanteil des Restfleisches wird nicht nur vom Grad der Vorzerkleinerung, dem Fleisch/Knochen-Verhältnis im Ausgangsmaterial und dem Gerätetyp, sondern auch von der anatomischen Lokalisation und dem Alter des Knochens bestimmt.

Im Separat älterer Tiere kommen erheblich höhere Knochengehalte als in vergleichbaren Proben jüngerer Individuen vor. Der altersbedingte Anstieg der Calcifizierungsquote im Knochen führt zu einer leichteren Fragmentbildung (GRUNDEN u. MAC NEIL, 1973).

Bei der Separation von stark knorpelhaltigen Lämmerbrüsten fanden FIELD et al. (1974 a) unerwartet wenig Knorpelgewebe wieder, weil dieses im Vergleich zu Knochen weichere Material nicht so stark zur Bruchstück-

Tabelle 1: Gesamtkeimgehalt verschiedener Separatorfleischproben

Untersucher / Herkunft der Probe		Gesamtkeimzahl / g	
OSTOVAR et al. (1971)			
Geflügelseparatorenfleisch			
Separierung sofort nach d. Schlgtg.		3,25 x 10 ⁵	
Separierung n. 5 tåg. Lag. b. 3-5°C		7,10 x 10 ⁵	
BEM und LEISTNER (1974)			
Schwein:	Rücken und Nacken	2 x 10 ⁷ ,	Abnahme gering ^x
	Schwänze		Abnahme deutlich
	Bauchknorpel		Abnahme gering
Rind:	Ochsenschwänze	9 x 10 ⁶ ,	Zunahme deutlich ^x
	Rückenknochen		Zunahme deutlich
	Köpfe		Zunahme stark
	Halsknochen		Abnahme deutlich
Geflügel:	Hühnerhälse und -brust	2 x 10 ⁶ ,	Abnahme gering ^x
	Hühnerkarkassen		Zunahme stark
	Putenrücken		Abnahme gering
KNORR et al. (1974)			
Schwein:	Rippen,sauber entbeint	1,2 x 10 ⁵	
	Schwänze, mit Haut	1,5 x 10 ⁷	
	(schlecht geputzt)		
	Köpfe, sauber entbeint	3,0 x 10 ⁷	
Rind:	Köpfe, sauber entbeint	2,4 x 10 ⁶	
LINKE et al. (1974)			
Flüssiges Fleischhomogenat		7,4 x 10 ⁵	

^x Aufgeführt sind die vorher ermittelten Keimgehalte im Ausgangsmaterial für jede Tierart. Zusätzlich wird die Keimzahlentwicklung während des Entknochungsvorganges beschrieben. Dabei bedeutet:
gering = eine halbe Zehnerpotenz
deutlich = eine Zehnerpotenz
stark = anderthalbe Zehnerpotenzen

bildung neigt. Somit würde bei der Verwertung junger Tiere der Knochenanteil in gewissen Grenzen gehalten werden. Da das Separatorenfleisch während des Herstellungsprozesses im Entknochungszyylinder nicht homogen ist, sondern einer starken Fraktionierung unterliegt, differieren die einzelnen Schichten auch in ihrer Zusammensetzung. Diese Tatsache ist sowohl bei der Entnahme von Analysenproben als auch bei der Weiterverwendung des Produktes von größter Bedeutung.

Bezüglich des Protein- und Fettgehaltes sowie des Trockensubstanzanteils wurde kein Unterschied zum manuell gewonnenen Restfleisch von Lämmerbrüsten festgestellt (FIELD u. RILEY, 1974).

Eine Abnahme des Protein- und Fettgehaltes im Separat wiesen ANDERSON u. GILLET (1974) bei ähnlichen Untersuchungen an Hammelteilen nach.

Als Kriterium für die substantielle Beschaffenheit von Separatorfleisch ist auch der Trenneffekt anzusehen. Unter Berücksichtigung der Ausbeute wird er als Knochenanteil des Ausgangsmaterials im Vergleich zum Knochenrückstand im separierten Fleisch definiert. Bei knochenreichen Rohstoffen verschlechtert sich der Trenneffekt, d. h. der Restknochengehalt im Separat nimmt zu. Durch ein günstigeres Fleisch/Knochen-Verhältnis kann der relative Knochenanteil im Separationsprodukt gesenkt werden (ARNETH et al., 1976).

Verschiedene analytische Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 2 (S. 12) zusammengestellt.

DUDLEY (1975) stellte fest, daß nicht alle Separationsverfahren ein Produkt mit höchstens 0,5 % Knochen garantieren. Durch sorgfältigere Auswahl der Lochscheiben bei der Vorzerkleinerung und einer geringeren Lochgröße im Preßsystem wäre jedoch eine Senkung des Knochenabriebs um 40 - 50 % zu erreichen. Auch könnte

Tabelle 2: Ergebnisse chemischer Analysen aus maschinell gewonnenem Restfleisch

Untersucher / Herkunft der Probe	Ausbeute %	Wasser %	Fett %	Protein %	Calcium %	Knochen %
GOODWIN und WEBB (1968) Hähnchenfleisch	---	61,0	26,8	10,9	0,16	---
GRUNDEN und MAC NEIL (1973) Geflügelfleisch (Mittelwert ver- schiedener Messungen)	---	---	---	---	0,71	---
ANDERSON und GILETT (1974) Hammel: Rücken	65	73,12	8,01	17,52	---	---
Gliedmaßen	67	74,63	5,20	18,08	---	---
Schulter	57	74,20	6,33	17,45	---	---
Brust	41	73,22	8,47	17,22	---	---
FIELD et al. (1974a) Hammelkarkassen	52	73,77	8,62	---	0,09	---
Hammelkarkassen	70	64,20	17,10	---	0,20	---
Hammelkarkassen	84	56,22	24,93	---	0,27	---
Lammnacke	32	64,47	15,76	---	0,21	---
Lammnacke	69	55,41	25,39	---	0,37	---
Lammschulter	65	67,13	13,56	---	0,18	---
Lammschulter	84	66,13	14,72	---	0,26	---

Tabelle 2: Fortsetzung

Untersucher / Herkunft der Probe	Ausbeute %	Wasser %	Fett %	Protein %	Calcium %	Knochen %
FIELD et al. (1974a)						
Lammbrust	75	47,55	35,52	---	0,11	---
Lammbrust	87	45,23	37,26	---	0,13	---
Lammgliedmaßen	74	66,95	11,53	---	0,21	---
Lammgliedmaßen	84	66,17	12,68	---	0,28	---
KNORR et al. (1974)						
Schwein: Rippen sauber entbeint	---	58,2	23,9	15,6	0,03	---
Schwänze mit Haut (schlecht geputzt)	---	53,8	28,2	14,9	0,04	---
LINKE et al. (1974)						
Flüssiges Fleischhomogenat	---	86,80	2,66	6,45	0,22	---
PFEIFFER (1975)						
Flüssiges Fleischhomogenat	---	---	3,53	4,90	0,22	---
FIELD (1976)						
Schwein: Schinken	---	54,81 x	39,02	10,21	1,39	---
Lende	---	46,15 x	29,53	14,01	0,41	---
Kalb: Schulter	---	26,27 x	7,56	12,85	1,76	---
"Frames" (Rippenstücke)	---	26,64 x	6,79	17,57	0,71	---
Rücken	---	24,21 x	5,81	15,98	0,54	---

Tabelle 2: Fortsetzung

Untersucher / Herkunft der Probe	Ausbeute %	Wasser %	Fett %	Protein %	Calcium %	Knochen %
FIELD (1976)						
Kuh: Rippen	---	50,33 x	31,87	12,98	1,55	---
Rumpf	---	58,06 x	41,89	10,05	1,55	---
Lende	---	50,97 x	33,38	11,62	1,50	---
Rind: Nacken	---	35,13 x	13,76	17,18	1,06	---
NEUHÄUSER (1977) xx						
1. Pressung: Rindervorderviertel	---	57,3	24,4	17,2	---	0,64
Schweineknochen	---	62,4	18,4	18,2	---	0,51
2. Pressung: Rest der 1.Press. Rindervorderviertel	---	44,4	38,8	14,9	---	1,74
Rest der 1.Press. Schweineknochen	---	58,3	23,5	17,0	---	1,24

Die gestrichelte Darstellung zeigt, daß keine Analysenwerte von den Autoren angegeben wurden.

^x Analysenwerte liegen nur in Trockensubstanz vor.

^{xx} Das Ausgangsmaterial dieser Versuche waren grobentbeinte Rindervorderviertel und Schweineknochen, die mit einem Preßdruck von 240 bis 260 bar separiert wurden.

Der Rückstand der 1.Pressung wurde mit erhöhtem Druck(320 bis 350 bar) noch einmal separiert.

durch vorherige Entfettung oder Zugabe von Magerfleisch ein zu hoher Fettanteil bzw. ein zu niedriger Mindesteiweißgehalt im Ausgangsmaterial ausgeglichen werden.

Bei histologischen Untersuchungen an flüssigem Fleischhomogenat lag die Muskulatur nur noch in stark zerkleinerter, destrukturierter Form vor. Weiterhin konnten kollagenes und elastisches Bindegewebe, Gefäßpartikel, lymphatisches Gewebe und Knochen im histologischen Präparat identifiziert werden. Auffallend war der geringe Bindegewebsgehalt, der sich auch in einer chemischen Analyse bestätigte (LINKE et al., 1974).

Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte eine Abhängigkeit zwischen den strukturellen Erscheinungen von Geflügelseparatorenfleisch und der im Entbeinungszyylinder verwendeten Lochgröße festgestellt werden. Eine Verkleinerung der Durchtrittsöffnungen verstärkte die Zerstörung der muskulären Strukturen (SCHNELL et al., 1974).

2.5. Verwendungsmöglichkeiten von maschinell entbeintem Fleisch

Durch den vermehrten Einsatz von Hartseparatoren wurden größere Mengen von Restfleisch der verarbeitenden Industrie angeboten. Die Einsatzmöglichkeiten dieses Produktes wurde fast in allen Bereichen der Fleischwarenindustrie empfohlen. Die Verwendungsvorschläge reichten von Fleischsalaten, über Dosenfleisch, Hackfleisch bis hin zur Babynahrung (NOBLE, 1974).

Eine ähnliche Palette von Erzeugnissen, die unter Zusatz von Separatorfleisch (mechanically deboned red meat) hergestellt werden können, bot FRIED (1976) an. Danach könnte maschinell gewonnenes Restfleisch zu folgenden Fleischwaren verarbeitet werden: Fleischpasteten, Corned Beef in Dosen, frischer Rinder- und Schweinewurst,

Brühwürsten, Braunschweiger, Leberwürsten, Frühstücksfleisch, Hackbraten, Spaghettisauce, Pizzasauce etc..

Hervorragende Eignung zur Herstellung von Brühwürsten wurde dem Geflügelseparatorenfleisch zugesprochen, bei dessen Verwendung sich ein Zusatz von Wasser und Fett erübrigen soll (BAKER, et al., 1974). Darüber hinaus untersuchten diese Autoren den Einfluß der Kutterzeit bei der Herstellung von "Frankfurtern" aus drei Sorten von Geflügelseparatorenfleisch. Als Qualitätskriterien dienten die Erhitzungsstabilität, die Viskosität und die Ausbeute der Würste. Hinsichtlich dieser Merkmale besaß die Dauer der Kutterzeit einen geringen Einfluß. In der Beschaffenheit der von drei Maschinen produzierten Separate bestanden jedoch signifikante Unterschiede.

Haftet bei der Verarbeitung dem Geflügeltierkörper noch die äußere Haut an, so erhöht sich der Fettanteil des Separates, bei sinkenden Wasser- und Proteinwerten. Beim Trennprozeß kann das Fett zusammen mit der Muskulatur die Öffnungen des Entknochungszyinders passieren. Der Eiweißanteil der Haut, der hauptsächlich aus kollagenem Bindegewebe besteht, verbleibt dagegen im Hartseparat. Die Verwendung derartig fetthaltiger Separate zur Brühwurstherstellung verschlechtert die Emulsionseigenschaften des Erzeugnisses (SATTERLEE et al., 1971; SCHNELL et al., 1973).

WIESE (1976) lehnte die unbegrenzte Nutzung des Geflügelseparatorenfleisch ab. Es sollte nur Brüh- und Kochwürsten sowie tiefgefrorenen und erhitzten Fleischerzeugnissen zugesetzt werden. Die Verarbeitung zu Rohwurst birgt die Gefahr einer erhöhten bakteriellen Kontamination in sich. Die Auswirkungen eines 15 %igen Zusatzes von Truthahnseparatorenfleisch zu Brühwurst überprüften FRONING et al. (1971). Bei Einsatz von frischen

Separaten zeigten sich im Vergleich zu Würsten, die ausschließlich unter Verwendung von Rind- und Schweinefleisch hergestellt worden waren, keine Unterschiede im Geschmack, der Emulsionsstabilität und im Keimgehalt. Der Zusatz eines über 90 Tage bei -24°C gelagerten Separates führte zu einer deutlichen Qualitätsminderung.

Beim Einmischen von entbeintem Fleisch muß mit Bindungsverlusten und Gewichtseinbußen im Brühwurstbrät gerechnet werden (TÄNDLER, 1974).

Bei der organoleptischen Prüfung von Brühwürsten, die 50 % maschinell entbeintes Hammelfleisch enthielten, hatten Testpersonen eine deutliche Unterscheidung hinsichtlich des wahrnehmbaren Knochenanteils gegenüber Würsten aus manuellem Knochenputz treffen können, sofern der Separator mit einer Lochgröße von 1,016 mm arbeitete. Da es sich hierbei um die zur Geflügelentbeinung verwendete Geräteeinstellung handelte, forderten die Autoren, daß die Hammelentbeinung nicht mit den für die Geflügelseparation üblichen Maschinen bzw. Einstellungen durchgeführt werden dürften. Erst eine Lochgröße von höchstens 0,635 mm erschien aufgrund weiterer Untersuchungen an geschlachteten Schafen als unbedenklich (FIELD et al., 1974 a).

Bei anderen Versuchen wurde die Grenze des sensorisch wahrnehmbaren Qualitätsabfalls einer Brühwurst bei einem Zusatz von 5-7 % maschinell entbeinten Fleisches ermittelt (TÄNDLER, 1975 a).

Die BUNDESANSTALT für FLEISCHFORSCHUNG (1976) wollte den Separatorenfleischzusatz auf jene Brüh- und Kochwürste begrenzt sehen, denen traditionell Polkfleisch beigemischt worden war. Außerdem wurde die Forderung WIESE's unterstützt, derzufolge die Fleischwarenherstellung in eine "weiße" Geflügel- und "rote" Rinder- und Schweine-Seite getrennt werden sollte, da mit ei-

nem größeren Risiko von Seiten des Geflügelseparatornflisches zu rechnen sei.

Das nach dem physikalisch-chemischen Verfahren der HERTA KG hergestellte flüssige Fleischhomogenat (FFH) wurde als ein unter Verwendung von Fleisch geschaffenes Zwischenprodukt zur Brühwurstproduktion angesehen, dessen Zutaten (Wasser und Nitritpökelsalz) legitime Bestandteile eines Fleischerzeugnisses seien. Außerdem besteht für den FFH-Zusatz eine technologisch bedingte Limitierung, die PFEIFFER (1976) mit dem hohen Wassergehalt dieses Rohstoffes begründete. Beeinträchtigungen der Brühwurstqualität stellten sich ein, wenn mehr als 10 % FFH dem Brät zugefügt worden waren.

2.6. Zur lebensmittelrechtlichen Situation bei der Verarbeitung von Restfleisch

Die ersten gesetzlichen Regelungen über die Zusammensetzung und Einsatzmöglichkeiten von maschinell gewonnenem Restfleisch entstanden in den USA. Schon 1971 hat der "Code of Federal Regulations" den Knochengehalt im Geflügelseparatornflisch auf 1 % begrenzt (GRUNDEN u. MAC NEIL, 1973).

Das US Department of Agriculture (USDA) erließ am 6. November 1974 eine Verordnung (MPJ Bulletin Nr. 865) wonach Knochen mit anhaftendem Fleisch von gekühlten Schlachttierkörpern bei höchstens 4° C zu lagern und spätestens nach 72 Std. zu verarbeiten sind. Läßt sich diese Frist nicht einhalten, müssen die Ausgangsmaterialien eingefroren werden. Teile von warmen Schlachttierkörpern sollen innerhalb von 4 Stunden maschinell verarbeitet sein, wenn sie nicht 72 Std. bei maximal 4° C gelagert bzw. bei mindestens -18° C eingefroren werden können. Die Partikelgröße der Knochenteilchen im Restfleisch darf 2,5 mm nicht überschreiten, der höchstzulässige Calciumgehalt beträgt 0,5 %. Bei ei-

nem Proteinwirkungsverhältnis von 2,5 % schreibt die Verordnung für Rind-, Kalb- und Hammelseparatorenfleisch einen Mindesteweißgehalt von 15 %, für Schweinestfleisch von 14 % vor. Entsprechend lauten die Mindesteweißgehalte für gekochtes Restfleisch 21,4 bzw. 20 %. Der Fettanteil darf 30 % nicht überschreiten. Die aerobe Keimzahl ist auf 10^5 Mikroorganismen begrenzt (HADLOK, 1975; TÄNDLER, 1975 b).

In den Vereinigten Staaten prüft das USDA lebensmitteltechnologische Neuerungen eingehend und läßt nur hygienisch unbedenkliche Methoden und daraus resultierende Produkte zu, die als "USDA approved" ausgezeichnet werden. So wurden im April 1976 Standards für Separatorenfleisch schlachtbarer Haustiere (mechanically deboned red meat) geschaffen (Federal Register 41 (82)), die den Herstellungsprozeß vom Ausgangsmaterial bis zum fertigen Erzeugnis regeln. Knochen mit anhaftendem Fleisch gekühlter Schlachttierkörper sollen spätestens 1 Stunde nach der Handentbeinung separiert bzw. nicht länger als 72 Stunden bei 40°F ($5,5^{\circ}\text{C}$) gelagert werden. Verzögert sich die Bearbeitung, ist sofortiges Einfrieren bei mindestens 0°F ($-17,8^{\circ}\text{C}$) erforderlich. Knochen mit anhaftendem Fleisch von frisch geschlachteten Tierkörpern müssen innerhalb von 4 Stunden maschinell entbeint, gekühlt oder eingefroren werden. Das anfallende Separatorenfleisch soll umgehend seiner endgültigen Bestimmung zugeführt oder bei den oben angeführten Temperaturen aufbewahrt werden. Nur wenn eine Identifikation der Charge sowie eine Kontrolle von Temperatur und Zeit gewährleistet sind, darf das Restfleisch den Herstellerbetrieb verlassen (FRIED, 1976).

Einer Erweiterung der "Fleischdefinition" durch das USDA im Federal Register 41 (82) zufolge, wurde maschinell entbeintes Fleisch in drei verschiedene Gruppen unterteilt:

1. maschinell entbeintes Fleisch, 2. maschinell entbeintes Fleisch zur Verarbeitung, 3. maschinell entbeintes Fleisch, das durch Hitzebehandlung für technische Zwecke nutzbar gemacht worden ist.

In diesem Erlaß wurden auch Zugabelimitierungen festgelegt. So darf den Fleischerzeugnissen reines Separat bis 20 % zugesetzt werden, das zur Verarbeitung bestimmte Rohmaterial nur zu 15 %. Neben den Behandlungs- und Verarbeitungsvorschriften bestehen Qualitätsnormen für die beiden unterschiedlich definierten Separationsprodukte, die tabellarisch zusammengefaßt wurden (die in Klammern genannten Werte stellen die angestrebten Grenzen dar, während die Zahlen vor den Klammern als Übergangsregelung gelten).

	Mind. Prot. %	PER %	Max. F. %	Ca-Geh.%
1. Masch. entbeint. Fleisch:	14 (14)	2,5 (2,5)	30 (30)	0,5 (0,75)
2. Masch. entbeint. Fleisch zur Verarbeitung:				
	10 (10)	2,5 (2,5)	60 (-)	0,75 (1,0)

Ähnliche rechtliche Regelungen stehen in der Bundesrepublik Deutschland zur Zeit noch aus. Doch wird zu diesem Problem eine heftige Diskussion geführt, die sogar Eingang in die Tagespresse gefunden hat. Der DEUTSCHE FLEISCHERVERBAND (1975) hielt die Zugabe von Separatorfleisch zu Brüh- und Kochwürsten aller Qualitätsstufen nicht für gewerbeüblich und nicht der Verbrauchererwartung entsprechend. Auch sei dieses Produkt aus analytischer Sicht nicht mit dem herkömmlichen Knochenputzfleisch vergleichbar. Darüber hinaus würde die Genehmigung der maschinellen Fleischgewinnung eine zusätzliche Wettbewerbsverzerrung zuungunsten kleinerer und mittlerer Betriebe schaffen.

Schon LINKE und THUMSER (1964) wiesen nach, daß ein technisch unvermeidbarer Knochenanteil in jedem Wurstgut vor-

kommen kann. Bei gewerbeüblicher Zerlegung des Schlacht-
tierkörpers entstehen Knochensplitter und -späne, die
auf der Fleischoberfläche haften und dann in das Erzeug-
nis gelangen. Von einer "Knochenputzverarbeitung" kann
erst gesprochen werden, wenn der histometrisch ermit-
telte Knorpel/Knochenanteil 1 Vol. % übersteigt.

Hingegen ergaben Analysen von Knochenputzfleisch mit
Hilfe verschiedener Methoden einen Knochengehalt von
weniger als 0,4 % (BRÜNING-OELTJEN, 1977).

Die lebensmittelrechtliche Stellung des Separatoren-
fleisches hat LINKE (1974) anhand der deutschen Lebens-
mittelgesetzgebung durchleuchtet. Er bescheinigte die-
sem Erzeugnis "Lebensmittelcharakter" (§ 1 Abs. 1 LMBG),
auch wenn es als Zwischenprodukt zu sehen sei. Weiter-
hin bestehe keine Veranlassung, nach § 9 die Herstellung
von Separatorenfleisch zu verbieten oder die Anwendung
bestimmter Verfahren vorzuschlagen. Die Partikelgröße
der vorkommenden Knochen erfülle nicht den Tatbestand
der "Gesundheitsgefährdung" gemäß § 8 (LMBG). Ebenso-
wenig gelte dieser Einwand für die hygienische Beschaf-
fenheit. Knochen seien auch kein Zusatzstoff, sondern
müßten als Stoff "natürlicher Herkunft" gelten. Unter
Verwendung von Separatorenfleisch hergestellte Erzeug-
nisse besäßen weder die Eigenschaft "nachgemachter"
Lebensmittel (§ 17 Abs. 1 Nr. 2 a) noch erwecken sie
den Anschein einer besseren als der tatsächlichen Be-
schaffenheit (§ 17 Abs. 1 Nr. 2 c). Zum Schutze des
Verbrauchers sei eine Verordnung anzustreben, in der
unter Anlegung strenger Maßstäbe ein Grenzwert für den
Gehalt "technologisch unvermeidbarer" Knochenpartikel
aufgestellt wird. Die Beurteilung solle sich auf den im
Endprodukt vorkommenden Knochenanteil beziehen. Aller-
dings sei zu fragen, inwieweit der Zusatz von Separatoren-
fleisch zu einer "nicht unerheblichen Minderung des

Nähr- und Genußwertes" gemäß § 17 Abs. 1 Nr. 2 b LMBG führt.

Diese Bedenken hinsichtlich einer Verminderung des Nähr- und Genußwertes bzw. der Brauchbarkeit durch den erhöhten Knorpel- und Knochenanteil teilte WIESE (1976) nicht. Wegen des in der Bundesrepublik Deutschland bestehenden Hygieneprinzips lehnte er aber das Einbringen von Vorschriften, Hygienestandards und Grenzwerten für Hartseparatorenfleisch in die Hackfleisch-VO ab und empfahl, eine gesonderte Separatorenfleisch-VO zu schaffen, die in ihren Beurteilungskriterien und Standards diesem labilen Produkt eher entspräche.

2.7. Nachweis von Knochen in Lebensmitteln

Rechtliche Regelungen für die Verarbeitung von maschinell entbeintem Fleisch und insbesondere eine Limitierung des Knochengehaltes in Zwischen- oder Fertigprodukten setzen für die Lebensmittelüberwachung das Vorhandensein geeigneter Analysemethoden voraus. Hierbei können direkte und indirekte Verfahren angewendet werden. Die indirekte Methodik beruht auf einer chemischen Aufschließung des Knochengewebes und dem anschließenden Nachweis von Calcium als Leitsubstanz. Zum direkten Nachweis, bei dem Knochen als solcher qualitativ oder quantitativ erfaßt wird, steht dagegen eine Reihe unterschiedlicher Techniken zur Verfügung.

2.7.1. Direkter Knochennachweis

2.7.1.1. Sedimentationsmethoden

Beim Sedimentationsverfahren werden Mehrkomponentenkörper in einem flüssigen Substrat suspendiert, und die einzelnen Bestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen spezifischen Gewichte abgetrennt. Eine solche Methode wurde schon in einem Runderlaß des RmDI (1942) für die Untersuchung von Fleischfuttermitteln mit Hil-

fe von Tetrachlorkohlenstoff als Sedimentationsflüssigkeit vorgeschrieben.

Modifiziert wurde später folgende Methode angewandt: der Doseninhalt wird durch ein 10minütiges Kochen in Wasser extrahiert und die überstehende Brühe abgeseigt bzw. filtriert. Das zurückbleibende Probengemisch wird in $MgSO_4$ -Lösung übertragen, in der sich die schwereren Knochenpartikel absetzen und quantitativ erfaßt werden können (KREBMANN, 1968).

In Anlehnung daran wurde zum Nachweis von Knochenpartikeln in Wursterzeugnissen folgende veränderte Technik empfohlen: Eine gewolfte 10g-Probe wird in 100 ml gesättigter $MgSO_4$ -Lösung verrührt und in einen Sedimentiertrichter, der mit einem Ablaufschlauch verbunden ist, übertragen. Nach 2stündiger Trennungsdauer wird das Sediment über den Schlauch abgelassen und quantitativ bestimmt (ANHALT, 1974; SCHAAL u. ANHALT, 1974; WENZEL et al., 1974).

2.7.1.2. Enzymatische Verdauung

Auch durch Einwirkung eines proteolytischen Enzyms können Knochensplitter in Wursterzeugnissen nachgewiesen werden. Eine 50g-Probe wird in einer Papainlösung 5 Stunden bei $37^{\circ}C$ geschüttelt, und ein entstandener Rückstand wird zentrifugiert. Das Sediment wird gewaschen und in einem Tetrachlorkohlenstoff-Gemisch getrennt. Der sich dabei absetzende Knochenanteil der Probe wird gewogen und entspricht ca. 50 % der ursprünglichen Feuchtknochenmenge im Ausgangsmaterial (VANGEND, 1971).

2.7.1.3. Laugenbehandlung

Mittels Laugenbehandlung ermittelte SINELL (1956 a) in Anlehnung an DILLER (1941) den Knochengehalt in Dosenleberwurst. Das Prinzip besteht in der Verkochung or-

ganischen Materials mit Alkalien (KOH) und der anschließenden Veraschung des Rückstandes, der auch polarisationsmikroskopisch identifiziert werden kann. Nach Einfeldung von Korrekturfaktoren wird der Knochenanteil direkt berechnet.

In einer Modifikation dieses Verfahrens kann auch alkoholische KOH-Lösung verwendet werden (GERATS u. TERBIJHE, 1975).

2.7.1.4. Histologischer Knochennachweis

Knochen ist nicht nur chemisch, sondern auch im histologischen Schnitt zu identifizieren. Bei Anwendung einer in der Routinediagnostik üblichen Färbung können die Knochenpartikel in Fleischerzeugnissen aufgrund ihrer Struktureigenheiten erkannt werden. Entsprechende Hinweise finden sich bei PRÄNDL (1961). Der polarisationsmikroskopische Nachweis von Knochen wurde von SINELL (1956 b) beschrieben. KOSSA hat bereits 1901 Knochen durch Imprägnierung des phosphorsauren Kalkes selektiv dargestellt, indem er das Präparat mit Silbernitrat überschichtete, nach längerer Lichteinwirkung in Pyrogallussäurelösung entwickelte und danach in Fixiernatron fixierte. Durch die Lichteinwirkung entsteht aus Silbernitrat Silberphosphat, das dann zu schwarzem kristallinen Silber reduziert wird.

Pyrogallol als intensives Reduktionsmittel verstärkt diesen Prozeß (KRAUSE, 1926). Die Knochen erscheinen nach dieser Behandlung als tiefschwarze Partikel. Die Belichtung wurde von ERNST (1974) mit Hilfe einer Glühbirne intensiviert. Über den qualitativen Nachweis hinaus bestimmten LINKE u. THUMSER (1964) sowie HILDEBRANDT et al. (1975) mit Hilfe der Point-Count-Technik den Flächenanteil des Knochengewebes in histologischen Schnitten verschiedener Lebensmittel tierischer Herkunft.

Zur histometrischen Bestimmung von Strukturbestandteilen histologischer Präparate kann auch die Fernsehbild-Computer-Analyse eingesetzt werden, da sie trotz geringen Arbeitsaufwandes exakte und reproduzierbare Meßergebnisse garantiert (HILDEBRANDT et al., 1977). Dabei wird das farbige Mikroskopbild von einer Aufnahmeröhre abgetastet, in 10 verschiedene Helligkeitsstufen umgesetzt und auf einem Bildschirm entsprechend seiner Graukontraste sichtbar gemacht. Um einzelne Strukturen des Fernsehbildes selektiv erfassen zu können, unterbricht ein Impulshöhendiskriminator (D_{11}) die Übermittlung der Videosignale vom Aufnahme- zum Sichtgerät. Durch Vorgabe einer variablen Graustufenschwelle läßt der Diskriminator nur solche Bildinhalte zur Registrierung auf dem Monitor erscheinen, die in ihrer Helligkeit unter dem vorgeschriebenen Schwellenwert liegen. Der Micro-Videomat ermöglicht aber nicht nur die Bestimmung von Flächenanteilen, sondern gestattet auch eine Partikelzählung.

Die Richtigkeit der Meßwerte ist von einer wirklichkeitsgetreuen Darstellung der Einzelkomponenten abhängig. Die verschiedenen Einstellungs- und Beurteilungskriterien bei Benutzung dieses Gerätes wurden von GAHM erläutert und zusammengefaßt.

2.7.1.5. Röntgenologischer Knochennachweis

Auch der röntgenologische Knochennachweis soll semiquantitativ auswertbar sein, sofern Vergleichsproben vorliegen. Aus der Anzahl der Verschattungen kann in grober Näherung auf die Höhe des Zusatzes von Separatorenfleisch geschlossen werden (ANHALT, 1974).

2.7.2. Indirekter Knochennachweis

Der Calciumgehalt einer Separatorenfleischprobe kann nur dann als Parameter für den Gehalt an Knochensub-

stanz dienen, wenn der Calciumspiegel des knochenfreien Fleisches, der Mineralisationsgrad und die anatomische Lokalisation des Knochens bekannt sind (LINKE et al., 1974).

3,5 % des Gesamtkörpers bestehen aus anorganischem Material, wobei Calcium und Phosphor, die überwiegend im Knochen vorkommen, mit 1,5 bzw. 1 % den größten Anteil besitzen (MERKEL, 1970).

Nach Untersuchungen von LANG (1957) an der Femurdiaphyse des Ochsen besteht die organische Grundlage des Knochens hauptsächlich aus kollagenen Fasern, die in ein Gel eines Mucopolysaccharid-Proteinkomplexes eingebettet sind. Die Mineralsubstanz des Knochens (71, 92 %) liegt in kristalliner Form vor. 36,7 % des anorganischen Bestandteils werden vom Calcium repräsentiert, jedoch ist die chemische Zusammensetzung der einzelnen Knochen nicht gleich.

Mit fortschreitendem Alter nehmen Fett- und Trockensubstanz des Knochens von Rindern, Schweinen und Schafen zu. Lediglich beim Geflügel ändert sich der Lipidgehalt nicht. Mit zunehmendem Ascheanteil steigt auch die Calciumkonzentration. In der chemischen Zusammensetzung zeigen die Knochen aber Unterschiede. Der Femur besitzt den höchsten Asche- und Ca-Gehalt (20,59-23,67 % Ca in der fettfreien Knochentrockensubstanz), während die Halswirbel die niedrigsten Werte (19,46-21,25 %) aufweisen (FIELD et al., 1974 b).

Um den nicht vom Knochen stammenden Calciumanteil und das unterschiedliche Alter der Tiere zu berücksichtigen, ist ein Umrechnungsfaktor und ein Korrekturglied eingeführt worden. Der Faktor beträgt bei Schwein und Rind $F = 4$; 6,25 bei Hähnchen und jungem Geflügel und bei älteren Tieren und Puten 4,55. Der Abzug für den physiologischen Calciumgehalt des Muskelfleisches

macht 0,015 % aus (BAKER, 1974). Der Knochen/Knorpelanteil berechnet sich wie folgt:

$$K = (\text{effektiver Calciumgehalt in Prozent} - 0,015) \times F.$$

Die von verschiedenen Autoren im knochenfreien Fleisch ermittelten Calciumgehalte sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

2.7.2.1. Calciumbestimmung

Zur Bestimmung des Calciumgehaltes in Lebensmitteln sind im wesentlichen zwei Methoden in Gebrauch. Die Atomabsorptionsspektralphotometrie (AAS) und ein photometrisches Verfahren. Die AAS hat sich zum quantitativen Nachweis bewährt, wie Untersuchungen von CHANT et al., 1977; FIELD et al., 1974 b; GRUNDEN u. MAC NEIL, 1973; LINKE et al., 1974 und WENZEL et al., 1974 gezeigt haben.

GRUNDEN u. MAC NEIL (1973) bestimmten mit der AAS den Knochengehalt in maschinell entbeintem Hühnerfleisch und fanden beim Vergleich mit der Calciumbestimmung mittels EDTA-Titration einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99$. Bei ähnlichen Vergleichsuntersuchungen mit der Sedimentationsmethode erhielten WENZEL et al., (1974) einen Wert von $R^2 = 0,881$ ($n = 106$).

Das methodische Prinzip der AAS liegt in der Erkenntnis, daß Atome durch die Aufnahme von Energie in Form von Lichtquanten ein niedrigeres Energieniveau mit einem höheren vertauschen können. Da die absorbierte Lichtenergie quantitativ ermittelt werden kann, sind Rückschlüsse auf die absorbierenden Teilchen möglich. Geräte zur Messung dieses Energiesprunges (Atomabsorptionsspektralphotometer) bestehen aus einer Hohlkathodenlampe, die ein typisches, vom untersuchten Element abhängiges Lichtspektrum aussendet. Die zur Analyse benötigte Wellenlänge wird mittels eines Monochromators

Tabelle 3: Calciumgehalte verschiedener knochenfreier
Fleischproben

Untersucher / Herkunft der Probe	Calciumgehalte im Feuchtgewicht
HECHT et al. (1973)	
Rind	337 ppm ^x
Schwein	517 ppm ^x
Kalb	252 ppm ^x
HECHT (1973)	
Schweinefleisch	127 ppm
Rindfleisch	92,2 ppm
Kalbfleisch	87,8 ppm
LAWRIE (1966)	
Säugetiermuskulatur nach Totenstarre	0,007 %
MERKEL (1970)	
Skelettmuskulatur	0,008 %
Fleisch (insgesamt)	0,013 %
PFAFF (1974)	
Kalbfleisch	0,0105 %
Rindfleisch	0,034 %
SCHORMÜLLER (1974)	
Kalbfleisch	6 mg/100g
Rindfleisch	4 mg/100g
Schweinefleisch	5 mg/100g
Hammelfleisch	3,2 mg/100g
Rindfleisch (mager)	2 mg/100g
Schweinefleisch (Schinken)	6 mg/100g
Huhn	12 mg/100g

x

Ergebnisse beziehen sich auf Trockensubstanz

herausgefiltert, durch einen Detektor in Elektronenstrom umgewandelt und zur Anzeige gebracht. Die Spezifität der AAS ist in starkem Maße von der Auswahl der verwendeten Lichtquelle und deren physikalischen Eigenschaften bestimmt. Grundsätzlich wird zwischen Flammen-AAS und flammenloser AAS unterschieden. Letztere besitzt zwar eine um den Faktor 1000 höhere Empfindlichkeit, für den Nachweis von Calcium reicht jedoch die Genauigkeit des Verfahrens, bei dem die Flamme als Atomisierungsmittel dient. Wegen seiner hohen Affinität zu Phosphor neigt Calcium beim Trockenvorgang zur Bildung schwer löslicher Calciumpyrophosphate. Diese chemischen Interferenzen werden durch die Zugabe von Lanthan oder Strontium ausgeschlossen. Aufgrund des geringen Löslichkeitsproduktes entstehen Lanthan- oder Strontiumphosphat, und die Absorption durch Ca-Atome kann ungehindert ablaufen (WELZ, 1972).

Eine kombinierte Methode des Knochennachweises entwickelten SOMMER u. MÜLDER (1975). Durch Erhitzung mit Guanidin-Harnstofflösung unter gleichzeitiger oxidativer Spaltung mit H_2O_2 wird eine 20 g-Probe verflüssigt und zentrifugiert. Nach mikroskopischer Identifizierung des Sedimentes und einer Erhitzung unter Zugabe von 10%iger Perchlorsäure wird mit Hilfe der AAS der Anteil freier Calciumionen gemessen.

Eine photometrische Methode zur halbautomatischen Ca-Bestimmung in einem HCl-Probenhydrolysat schlug ARNETH (1977) vor. Dabei wird das aufgeschlossene Material mit Kresolphthaleinkomplexon (KPK) und Diäthylaminbasenreagens vermischt und der entstehende Ca-KPK-Komplex photometrisch ausgewertet.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

Das Probenmaterial wurde dem Institut für Lebensmittelhygiene von verschiedenen Firmen sowie von Herrn Professor Dr. H. Linke (Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach) überlassen ^x. Neben seinem Separierungsprodukt stellte ein Produzent verschiedene Fleischerzeugnisse mit 5- und 10 %igem Zusatz an flüssigem Fleischhomogenat (FFH) zur Verfügung. Von den restlichen Wurstwaren war nur der Hersteller (5 verschiedene Hersteller), nicht jedoch die Rezeptur bekannt. Separatorfleischfreie Brühwürste unterschiedlicher Herkunft dienten zur Bestimmung der Blindwerte für die KOH-Auskochmethode sowie für die Atomabsorptionsspektralphotometrie (AAS). Insgesamt ordnete sich das Probenmaterial wie folgt:

- | | |
|--|--------------------|
| a. Flüssiges Fleischhomogenat (FFH) | n = 10 (Nr. 1-10) |
| b. Separatorfleisch (Rind) | n = 10 (Nr. 11-20) |
| c. Separatorfleisch (Schwein) | n = 4 (Nr. 21-24) |
| d. Brühwurst mit 10 %igem FFH-Zusatz | n = 10 (Nr. 25-34) |
| e. Brühwurst mit 5 %igem FFH-Zusatz | n = 10 (Nr. 35-44) |
| f. Separatorfleischhaltige Brühwurst
unterschiedlicher Herkunft | n = 7 (Nr. 45-51) |
| g. Brühwürste ohne Separatorfleisch-
zusatz (Blindwertproben) | n = 8 |

Wegen Materialmangels konnten die Proben 1, 4 und 5 bei der KOH-Auskochmethode nicht berücksichtigt werden.

^x Herrn Professor Dr. Linke und den Firmen, die für die Untersuchungen Material zur Verfügung stellten, sei an dieser Stelle für die gewährte Unterstützung gedankt.

3.2. Methodik

3.2.1. Calciumanalyse

Für die Ca-Analyse mit Hilfe der AAS wurde das Gerät, PERKIN ELMER 303 ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETER benutzt. Die Probenaufbereitung richtete sich weitgehend nach den Vorschriften für die "Analyse von Nahrungsmitteln" (PERKIN ELMER, 1974).

3.2.1.1. Reagentien

1. HCl-Lösung: 500 ml konz. HCl (37 %ig) mit 220 ml A. bidest verdünnen.
2. Lanthanlösung: 58,65 g La_2O_3 (Merck, Best.-Nr. 10982) werden mit A. bidest befeuchtet, unter langsamen Zufügen von 250 ml konz. HCl gelöst und mit A. bidest auf 1000 ml aufgefüllt. Die 5 %ige Lanthanlösung wird dem Probenfiltrat in 0,2 %iger Konzentration zugesetzt.

3.2.1.2. Probenaufbereitung

1. Das Probengut wurde homogenisiert, im Starmix mit Methylenchlorid entfettet und lyophilisiert (Lyophilisiergerät der Firma Martin Christ, Typ 398).
2. Vom entfetteten Lyophilisat wurde eine geeignete Menge eingewogen (min. 1 g, max. 5 g).
3. Die Probe wurde unter Zusatz von 25 ml HCl-Lösung 5 Min. zum Sieden erhitzt.
4. Nach dem Abkühlen wurde die Probe in einen 50 ml-Meßkolben übertragen und bis zur Marke mit A. bidest aufgefüllt.
5. Mit Hilfe eines Papierfilters (Selecta Falten Filter Nr. 5951/2) wurde die Probenlösung filtriert.
6. Verdünnung des Filtrates bis in den vorgeschriebenen Meßbereich mit A. bidest.
7. Zugabe von 0,2 %iger Lanthanlösung.

3.2.1.3. Eingabe der Probe und Durchführung der Messung

Das angemessen verdünnte Probenmaterial wurde mittels Ansaugschlauch aus einem Meßkolben in eine Flammenkammer verbracht. Die Flamme bestand aus einem Acetylen-Luft-Gemisch im Verhältnis 1 : 1. Die prozentualen Absorptionswerte konnten an einer Analoganzeige abgelesen werden, und mit Hilfe einer Tabelle wurden die Extinktionswerte bestimmt.

3.2.1.4. Eichung

Aus einer Calciumstandardlösung (Titrisol[®], Merck, Best.-Nr. 9943) wurden Eichlösungen folgender Konzentrationen hergestellt: 2, 4, 6 und 8 ppm. Wie die Untersuchungsproben enthielten sämtliche Eichlösungen einen 0,2 %igen Lanthanzusatz. Der Einfluß der Lanthanbeimischung wurde durch eine Blindwertermittlung bestimmt und korrigiert; darüber hinaus wurden die Eich- und Lanthanblindwertproben zwischen den Messungen mehrfach kontrolliert.

Gemäß der Anleitung von PERKIN ELMER wurde eine Eichkurve erstellt und die Konzentration der Probe bestimmt. Zur weiteren Berechnung wurde der effektive Calciumgehalt in % der Probe ermittelt.

3.2.1.5. Berechnung

Der Knochenanteil der untersuchten Proben wurde gemäß der von BAKER (1974) erstellten Formel berechnet:

$$\text{Knochen/Knorpelanteil} = (\text{eff. Calciumgehalt in \%} - 0,015) \times F.$$

Dabei wurde für Rind und Schwein $F = 4$ eingesetzt, und der Calciumabzug für den Nicht-Knochengewebsanteil betrug 0,015 % für Muskulatur. Für die Brühwurstproben wurde ein Blindwert gesondert bestimmt. Anhand von 8 knochenfreien Brühwürsten ließ sich in Parallelbestimmungen ein mittlerer Blindwert von 0,0098 % Calcium er-

rechnen und in die BAKER'sche Formel einsetzen.

3.2.2. KOH-Auskochverfahren

Die Probenaufbereitung, der Arbeitsgang und die Berechnung erfolgten in Anlehnung an die Anweisung von SINELL (1956 a).

3.2.2.1. Probenaufbereitung

1. Homogenisieren und Entfetten des Probenmaterials im Starmix mit Methylenchlorid.
2. Trocknen bei 125°C für 2 Stunden.
3. Einwiegen in ein 250 ml-Becherglas (min. 1 g, max. 5 g).
4. Aufschwemmen mit 100 ml einer frischen 10 %igen wässrigen KOH-Lösung und Zugabe eines Siedesteinchens. Flüssigkeitsstand markieren.
5. Probengemenge auf einem Magnetrührer zum Sieden bringen und 2 Std. am Brodeln halten. Verdampfende Flüssigkeit durch A. dest ersetzen.
6. Entfernen des Siedesteinchens und das Probengemenge scharf abzentrifugieren (3000 U/Min. für 15 Min.).
7. Den Bodensatz solange mit A. dest waschen und zentrifugieren bis der Flüssigkeitsüberstand klar ist.
8. Das Sediment über Nacht bei ca. 105°C trocknen.
9. Die Trockensubstanz in einen ausgewogenen Porzellantiegel übertragen und 20 Min. mit einem Teclu-Brenner glühen.
10. Tiegel im Exsikkator abkühlen und wiegen.

3.2.2.2. Berechnung des Knochengehaltes

Für die Berechnung des Knochengehaltes gilt die Formel:

$$\text{Knochengehalt (K)} = \frac{(R - c) \times 4}{3}$$

Dabei gibt der Faktor R die Knochenasche an. Der Faktor

c hingegen stellt einen nicht aus Knochenasche stammenden Rückstand dar, der überwiegend pflanzlicher Herkunft ist. Dieser Rückstand wurde an 8 knochenfreien Brühwurstproben in Parallelbestimmungen ermittelt und mit 0,28 % in die Formel eingebracht. SINELL (1956 a) gab dagegen einen Blindwert von 0,35 % an, während DILLER (1941) von einem Faktor von 0,31 % ausging. Den analytischen Substanzverlust des Knochens bezifferte SINELL auf 25 %, wodurch ein Multiplizieren mit $\frac{4}{3}$ erforderlich wurde.

In reinem Separatorfleisch ließen sich außer Knochen keine weiteren Rückstandskomponenten feststellen.

3.2.3. Histometrische Untersuchungen

3.2.3.1. Reagentien und Rezepturen

- a. Orange G: 2 g Orange G (Orange G für Mikroskopie, Merck, Best.-Nr. 6878) mit A. dest (100 ml) aufkochen, abkühlen lassen und filtrieren (Selecta Falten Filter Nr. 595 $\frac{1}{2}$). 8 ml Eisessig hinzugeben.
- b. Silbernitratlösung: 5 g Silbernitrat (Mol.-Gew. 169,87) in 100 ml A. dest auflösen.
- c. Pyrogallollösung: 1 g Pyrogallol krist. DAB 6 (Merck, Best.-Nr. 611) in 100 ml 96 %igen Alkohol lösen.
- d. Kaliumpermanganatlösung: 0,25 g KMnO_4 zur Analyse (Merck, Best.-Nr. 5082) in 100 ml A. dest vollständig lösen und abfiltrieren (s.o.).
- e. Kollodiumlösung: 6 ml Kollodium (DAB 6, Türk. Kod. 1940, Suppl. 1948) mit 90 ml absolutem Alkohol vermischen.

3.2.3.2. Probenaufbereitung

Das im Starmix homogenisierte, mit Methylenchlorid entfettete und in Alginat eingebettete Material wurde in 10 %igem Formalin fixiert und auf dem Gefriermikrotom

(Frigomat, Fir. Jung) in einer Dicke von $14 \mu\text{m}$ geschnitten. Die Schnitte wurden in lauwarmem Wasser aufgefangen. Der weitere Arbeitsgang:

1. Aufziehen und Trocknen des Schnittes auf einem mit Eiweißglyzerin beschichteten Objektträger.
2. Das montierte Präparat 5 Min. mit einer 0,25 %igen Kollodiumlösung reichlich überschichten und anschließend durch senkrechtes Aufstellen des Objektträgers ablaufen und trocknen lassen.
3. Den Schnitt 15 Min. in 70 %igen Alkohol aufbewahren und danach kurz in A. dest wässern.
4. Das Präparat mit einer 5 %igen Silbernitratlösung überschichten und 10 Min. in einer "Dunkelkammer" mit einer 60 Watt Glühbirne beleuchten. Danach kurz in A. dest spülen.
5. Den Schnitt 4 Min. in einer alkoholischen Pyrogallollösung entwickeln. Spülen in A. dest.
6. 6 minütiges Differenzieren in einer 0,25 %igen KMnO_4 -Lösung. Auswaschen in A. dest bis das ablaufende Wasser klar ist.
7. 15 Min. fixieren in ILFOSPEED[®] (Firma Ilford, Neu Isenburg). Danach 10 Min. spülen in fließendem Leitungswasser.
8. 5 Min. färben mit Orange G.
9. 2 Min. differenzieren in 96 %igem Alkohol.
10. 2 Min. in absoluten Alkohol verbringen.
11. 15 Min. in Xylol stellen.
12. Das Präparat mit Hilfe von Kanadabalsam mit einem Deckglas versehen.

3.2.3.3. Meßvorgang

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Micro-Videomat der Firma ZEISS besteht aus einem Lichtmikroskop mit Scanningtisch und Verlaufsfiltermonochromator, einer montierten Schwarz-Weiß-Kamera sowie einem Bild-

schirm mit Bedienungspult. An dieses System ist eine Steuer- und Recheneinheit (WANG 720 C) mit dazugehörigem Plotter (IBM Electric Typewriter, Modell 72) angeschlossen.

Es wurde stets mit einer Mikroskopvergrößerung von 1 : 7,875 (Objektiv 1 : 6,3; Optovar 1 : 1,25) gearbeitet. Das entsprach Präparatausschnitten mit einer Seitenlänge von 1,38 x 1,02 mm (d.h. 1,41 mm²). Dazu wurde ein horizontaler Bildvorschub von 1,50 mm und ein vertikaler von 1,05 mm gewählt. Aus diesen Vorgaben resultierten je nach Präparatgröße 100 bis 342 Meßbilder pro Schnitt, die nach einem mäanderförmigen Muster durchfahren wurden.

Der gesamte Untersuchungsvorgang bestand aus zwei Durchläufen mit den jeweiligen Filter- und Diskriminatorstellungen, wovon der erste dem Ausmessen der Gesamtstruktur diente. Nachdem der Scanningtisch beim letzten Bild stehen geblieben war, erfolgte der dekungsgleiche Rücklauf bis zum Ausgangspunkt, wobei die Knochenpartikel sowohl flächenmäßig als auch in ihrer Anzahl bestimmt wurden.

Mit Ausnahme der Filterregulierung geschah der Meßvorgang computergesteuert, durch Eingabe programmspezifischer Kenndaten. Darüber hinaus wurde die Meßwertstabilität automatisch überprüft. Den abgespeicherten Daten des ersten Durchlaufes wurden die dazugehörigen Werte des Rücklaufes zugeordnet und nach Abschluß der Messung miteinander verrechnet. Außer dem absoluten Knochen- und Gesamtgewebsanteil wurde als Endergebnis das gewogene Mittel des relativen Knochengehaltes aller Bilder ausgedruckt. Ebenso wurde die durchschnittliche Knochenpartikelzahl pro Meßbild ausgeschrieben. Ergänzend wurden die Ergebnisse mit dem Plotter graphisch dargestellt.

Die gesamten histometrischen Messungen wurden bei folgenden Apparateeeinstellungen durchgeführt:

Gewebskomponente	Diskriminator (D ₁₁)	Filterstellung
Knochenfläche u. Partikelzahl	385 Skalenteile	620 nm
Gesamtstruktur	450 Skalenteile	520 nm

(HILDEBRANDT u. KÖNIGSMANN, 1977).

3.2.3.4. Probenauswahl

Die Resultate der beiden chemischen Verfahren des Knochennachweises basierten jeweils auf Parallelbestimmungen, wobei die Einzelproben stets gesondert aufbereitet und bearbeitet worden waren. Die histologischen Präparate mußten zunächst mikroskopisch begutachtet werden, um die farbliche Qualität der Schnitte hinsichtlich ihrer Eignung für die Fernsehbildanalyse beurteilen zu können. Genügten mehrere Präparate gleicher Ausgangsproben den Anforderungen, so wurden auf Gerätewohl zwei Schnitte ausgewählt und vermessen. Bei den Proben 35-44 kamen nur solche Präparate in Betracht, die mindestens ein Knochenpartikel aufwiesen, weil nur anhand imprägnierter Knochenteilchen der Färbevorgang beurteilt werden konnte. Dadurch war eine gewisse systematische Verzerrung der Ergebnisse nicht auszuschließen.

3.3. Betrachtungen zur histologischen Methodik

Die Auswertung mit dem Fernsehbildanalysator verlangt farbintensive und in ihren Grauwerten ausreichend kontrastierte Objekte. Folglich mußten der Probenaufbereitung und dem Färbevorgang die größte Aufmerksamkeit gelten, wie alle bisherigen Erfahrungen mit diesen

Geräten zeigten (HILDEBRANDT et al., 1977).

Da beim Nachweis von Knochenputz oder Separatorfleisch der Knochen substantiell einheitlich und nicht strukturell differenziert dargestellt werden mußte, bot sich von den verfügbaren Färbemethoden zunächst der Kalknachweis nach KOSSA (1901) an. Hier wurden die Schnitte 10-60 Minuten mit einer 5 %igen Silbernitratlösung überdeckt und belichtet, für einige Minuten in Pyrogallussäurelösung übertragen und 3-5 Minuten mit Fixiernatronlösung behandelt. Die Eignung der KOSSA-Färbung für die fernsehtechnische Auswertung wurde an reinem Separatorfleisch sowie knochenhaltiger Brühwurst überprüft. Zwar stellte sich die Knochensubstanz einheitlich schwarz dar, jedoch wies das Restgewebe oft dunkelbraune Partien auf, so daß der mit Hilfe von Grauwerten arbeitende Micro-Videomat die verschiedenen Gewebekomponenten nicht mehr zu differenzieren vermochte. Deshalb ergab sich die Notwendigkeit, eine Gegenfärbung mit geringer Neigung zu Mischfarben anzuwenden, zumal die nach KOSSA gefärbten Präparate oft eine sehr dunkle Farbtönung besaßen.

In Anlehnung an KOSSA schlug ERNST (1974) ein modifiziertes Imprägnierungsverfahren vor, bei dem nach Entkalkung der Knochenpartikel mit Salpetersäure der Schnitt mit Silbernitrat überschichtet und 10 bis 15 Minuten mit einer Glühbirne beleuchtet wurde. Zur abschließenden Gegenfärbung empfahl der Autor Goldorange. Allerdings besaß bei Überprüfung dieser Methode das Knochengewebe ein mehr bräunliches Aussehen und verblaßte sehr schnell.

Weil die Helligkeitskontraste sowohl bei der KOSSA- als auch bei der ERNST-Färbung nicht den Anforderungen der Fernsehbildanalyse genügten, mußte anhand dieser beiden Techniken eine eigene Färbeanweisung erarbeitet werden.

So erwies es sich am günstigsten, den Schnitt bei der Silbernitratbehandlung 10 Minuten in einer Dunkelkammer mit einer 60 Watt Glühbirne zu beleuchten. In Abweichung von KOSSA wurde die Entwicklung der so geschwärzten Knochen 4 Minuten in einer alkoholischen Pyrogallol-lösung durchgeführt, da bei der vorgeschriebenen wässrigen Lösung eine unerwünschte Braunfärbung des übrigen Gewebes auftrat. Durch die alkoholische Zubereitung ließen sich die Fehlfarben weitgehend reduzieren, jedoch nicht vollständig verhindern. Deshalb wurde die KMnO_4 -Behandlung zur Differenzierung mißlungener Imprägnierungen in den Färbevorgang aufgenommen (ROMEIS, 1968). Dabei war zu berücksichtigen, daß eine zu konzentrierte bzw. zu lange Anwendung dieser stark oxydierenden Substanz nicht nur die Fehlprägnierungen, sondern auch die zur Darstellung gelangten Strukturen wieder entfärbte. Nach Versuchen mit verschiedenen konzentrierten KMnO_4 -Lösungen erwiesen sich eine 0,25 %ige Lösung und eine 6 minütige Einwirkungsdauer als optimal. Im Anschluß daran wurde der Schnitt, der eine gleichmäßige dunkelbraune Färbung angenommen hatte, 15 Minuten in ein handelsübliches Fixiermittel (ILFOSPEED®) getaucht, wodurch er bis auf die geschwärzten Knochenpartikel sein ursprüngliches, unbehandeltes Aussehen wieder erlangte. Dagegen führte die von KOSSA vorgeschriebene 5 %ige Fixiernatronlösung nicht zur Entfärbung von Skelettmuskulatur und Bindegewebe.

Zur Herstellung des apparatetechnisch notwendigen Helligkeitskontrastes durfte für die Gegenfärbung nur ein Farbstoff zum Einsatz kommen, der den übrigen noch im Schnitt enthaltenen Komponenten eine gleichmäßige und intensive Färbung verleihen konnte. Gemäß der Empfehlung von ERNST wurde zunächst auf 1- und 2 %ige Gold-orangelösung zurückgegriffen, ohne daß sich der gewünschte färberische Erfolg ergab. Weitere Versuche

mit Carmalaun, Pikrinsäure-Thiazinrot, Lichtgrün, Malachitgrün und Safranin erfüllten ebensowenig die Erwartungen, weil die Grauwertdifferenz zwischen Knochen und dem übrigen Gewebe zur automatischen Komponentenanalyse nicht ausreichte. Erst Orange G, das sich bereits bei der HEIDENHAIN'schen Azanfärbung modifiziert nach KOTTER (1955) bewährt hatte (HILDEBRANDT et al., 1977), erfüllte die gestellten Bedingungen. Die günstigste Einwirkungsdauer lag bei 5 Minuten. Um eine gleichmäßige Farbtintensität zu garantieren, wurde dem Färbevorgang nicht die übliche Alkoholreihe angeschlossen, sondern nur ein je 2 minütiges Behandeln mit 96 %igem und absolutem Alkohol. Abschließend konnte der Schnitt mit Kanadabalsam eingeschlossen werden.

Neben der Auswahl geeigneter Farbstoffe stellte die ausreichende Haftung des mit Eiweißglyzerin aufgezo- genen Schnittes auf dem Objektträger ein großes Problem dar. Im Verlaufe des Arbeitsganges lösten sich sowohl Knochenpartikel als auch Bestandteile des übrigen Gewebes immer wieder vom Untergrund ab. Als Ausweg hatte BENTLER (1968) angeregt, den getrockneten und montierten Schnitt mit einer 0,02 %igen Kollodiumlösung zu überschichten. Auf der Basis dieses Vorschlages ließ sich die Gewebefixierung erheblich verbessern. Trotzdem wurden einzelne Partikel weiterhin verloren, so daß Versuche mit höher konzentrierten Kollodiumlösungen mehr Erfolg versprachen. Dabei trat der von BENTLER beschriebene Schliereneffekt erst oberhalb einer Grenze von 0,5 % Kollodium auf. Um derartige Trübungen zu vermeiden und dennoch eine gute Haftung zu erzielen, empfahl sich eine Kollodiumkonzentration von 0,25 %.

Zur Überprüfung auf unerwünschte Substanzverluste wurden die Arbeitslösungen durch Abfiltration auf Rückstände, die von einer arbeitsbedingten Zerstörung des

Präparates herrührten, mikroskopisch untersucht. Es zeigte sich, daß bei dieser Rezeptur sowohl eine vollständige Haftung des Gesamtpräparates als auch die Erhaltung der Einzelstrukturen gewährleistet war.

4. ERGEBNISSE

4.1. Ermittlung des Knochengehaltes mittels Atomabsorptionsspektralphotometrie und KOH-Auskochverfahren

Bei einem Vergleich der Ergebnisse beider Methoden anhand der Tabellen 4 und 5 fiel die geringe Differenz zwischen den Parallelbestimmungen auf. Zur Verdeutlichung wurde der methodische Fehler nach der Formel $s = \left(\frac{\sum (x_{i1} - x_{i2})^2}{2n} \right)^{1/2}$

ermittelt. Er betrug für die AAS $\pm 0,0282$ und für das KOH-Auskochverfahren $\pm 0,0444$.

Ein deutlicher Zusammenhang war zwischen dem flüssigen Fleischhomogenat (FFH) (Probe 1-10) und den unter anteilmäßiger Verwendung hergestellten Produkten (Proben 25-44) zu erkennen. Dieser Tatbestand wurde für die chemischen Verfahren in der Tabelle 7 illustriert. Die einzelnen Verarbeitungsstufen stellten sich durch deutlich zu unterscheidende Knochengehalte dar. Gegenüber dem reinen Homogenat sank der Knochenanteil der Brühwurst mit 10 %igem FFH-Zusatz um eine Zehnerpotenz ab. Gemessen an den Analysendaten des Ausgangsmaterials lagen allerdings bei diesen Fleischerzeugnissen unverhältnismäßig hohe Calcium- und Aschegehalte vor.

Im Gegensatz zur KOH-Auskochmethode bewegte sich die Gruppe mit dem 5 %igen FFH-Zusatz bei der AAS ebenfalls im Erwartungsbereich.

Prinzipiell ermöglichten es beide chemischen Analyseverfahren, zwischen reinem Separatorfleisch und daraus hergestellten Produkten zu differenzieren. In Abb. 2 ist zu erkennen, daß sich drei Punkteschwärme ausbildeten, die Separatorfleisch (1×10^{-1} - 3 % Knochen), Brühwurst mit 10 %igem FFH-Zusatz (4×10^{-2} - 1×10^{-1} % Knochen) sowie Brühwurst mit 5 %igem FFH-Zusatz (1×10^{-2} - 4×10^{-2} % Knochen) repräsentierten. Eine Ausnahme bildeten die Proben 45 und 46, die als Brühwurst

in ihrem Knochengehalt verglichen mit anderen Produkten sehr hoch lagen.

4.2. Histometrische Knochenbestimmung mit Hilfe der Fernsehbildanalyse

Auch die stereometrische Analyse histologischer Präparate erlaubte eine quantitative Aussage über den Knochengehalt der einzelnen Proben, wobei der methodische Fehler in diesem Falle $\pm 0,1086$ betrug (vgl. hierzu S.42). Insbesondere ergab sich eine deutliche Trennung von flüssigem Fleischhomogenat einerseits und daraus hergestellten Brühwurstprodukten andererseits. Kein Unterschied bestand dagegen zwischen dem 10 %igen und dem 5 %igen FFH-Zusatz, wie die Werte der Tabelle 7 belegen. Aufgrund des Auswahlverfahrens waren die Ergebnisse der Knochenbestimmung bei 5 % FFH-Zugabe mit einem so großen Fehler behaftet, daß sie sogar höher lagen als die entsprechenden Vergleichsproben mit 10 %iger FFH-Beimischung.

Neben der Bestimmung der Flächenanteile erlaubte der Micro-Videomat auch eine Partikelzählung. Mit Hilfe dieser beiden Funktionen ließ sich die durchschnittliche Größe der vorkommenden Knochenteilchen ermitteln. Da die Meßfeldfläche mit $1,41 \text{ mm}^2$ vorgegeben ist, errechnete sich die mittlere Partikelgröße ($\mu \text{ m}^2$) aus dem Quotienten von absoluter Knochenfläche und Anzahl der Partikel pro Präparatausschnitt. Eine Vorstellung über die Streuung der Teilchengröße konnte auf diese Weise allerdings nicht gewonnen werden.

Das Merkmal der "mittleren Knochenpartikelgröße" bildete ein zusätzliches, probenspezifisches Beurteilungskriterium. So besaßen beispielsweise die Proben 2 und 50 zwar einen vergleichbaren Knochenflächenanteil von 0,377 bzw. 0,2735 Vol. %, doch differierte

die durchschnittliche Partikelgröße mit 232 bzw. 2983,5 μm^2 erheblich. Die Spannweite der in den 51 Proben vorkommenden Partikelgrößen lag zwischen 3632 bis 42 μm^2 (Tabelle 8).

Ausgehend von der Annahme, daß die vorkommenden Knochen-
teilchen eine kugelförmige Gestalt besitzen, was in gro-
ber Näherung sicherlich statthaft ist, leitete sich aus
der Flächenangabe auch der rechnerische Weg zur Ermitt-
lung eines durchschnittlichen Durchmessers ab. Über die
Formel $F = \pi r^2$ ergab sich für die Teilchen eine Spann-
weite im mittleren Durchmesser von 60,7 μm bis 7,6 μm ,
bei einem Median von 20,4 μm .

Der durchschnittliche Knochenanteil im histologischen
Präparat läßt sich mit Hilfe des gewogenen arithmeti-
schen Mittels angeben (Tab. 6). Auf die Berechnung der
zugehörigen Standardabweichungen innerhalb der Präpara-
te wurde verzichtet, da sie keine sinnvollen statisti-
schen Maßzahlen darstellen. Die Knochenfläche/Messfeld
ergibt eine nicht-symmetrische, deutlich linkssteile
Häufigkeitsverteilung (Abb. 5). Als Modellverteilung
scheint sich hier die logarithmische Normalverteilung
weit besser zu eignen. Sie kommt immer dann zur Anwen-
dung, wenn das Merkmal u. a. eine bestimmte Schranke
nicht unterschreiten kann. Diese einseitige Begrenzung
ist im vorliegenden Falle durch den Wert Null (=kno-
chenfreies Messfeld) gebildet.

Zur Charakterisierung dieses Zusammenhanges ist in
Abb. 5 ergänzend zur empirischen Häufigkeitsverteilung
der Knochenfläche eines Präparates mit 182 Messfeldern
die zugehörige logarithmische Normalverteilung darge-
stellt. Damit wird die Struktur innerhalb eines Prä-
parates gekennzeichnet, die trotz Homogenisierung ein-
zelne Messfelder mit höheren Knochenflächenanteilen
auftreten läßt. Da sich der Vergleich mit den übrigen

Methoden auf größere Probenumfänge bezieht, sollte als kleinste Einheit bei der histometrischen Untersuchung das vollständige Präparat zugrunde gelegt werden. Nach dem zentralen Grenzwertsatz der mathematischen Statistik werden die gewogenen arithmetischen Mittelwerte aus den Präparaten einer Grundgesamtheit wieder annähernd symmetrisch verteilt sein. Daraus resultiert als geeignetes Variabilitätsmaß die Ermittlung der Standardabweichung zwischen den arithmetischen Mittelwerten einzelner Schnitte.

Mit dem verwendeten Computer-Programm wurden nicht nur die Meßwerte der einzelnen Präparatausschnitte mit Hilfe eines Plotters ausgedruckt, darüber hinaus konnten diese Daten auch in Form eines Histogrammes gezeichnet werden. Die graphische Darstellung der Knochenpartikelzahlen/Meßfeld zeigte zumeist eine symmetrisch-eingipflige, selten zweigipflige Häufigkeitsverteilung (Abb. 3). Wurden für den gleichen Schnitt die Knochenflächen/Meßfeld aufgetragen, ergab sich stets ein extrem linkssteiler Kurvenzug (Abb. 4). Aus dem Vergleich beider Plottprogramme ließ sich die Schlußfolgerung ableiten, daß auch die Partikelgröße eine asymmetrische, linkssteile Verteilungsform aufweist. Folglich bildeten Knochen mit geringem Flächenanteil den überwiegenden Anteil des Knochenabriebs in Separatorenfleisch und den daraus hergestellten Produkten.

4.3. Vergleich zwischen den chemischen Verfahren und der histometrischen Technik

Bereits die graphische Darstellung erlaubte einige Schlußfolgerungen über die Beziehungen der beiden chemischen Verfahren untereinander sowie ihrer Korrelation zur histometrischen Technik. Zunächst bestand eine deutliche mittlere lineare Abhängigkeit zwischen allen drei Methoden. Bei Knochenanteilen unter $10^{-1} \%$

strebten jedoch die jeweiligen Punkteschwärme auseinander. Aus der gelockerten Abhängigkeit ließ sich eine verminderte Meßgenauigkeit in diesem Bereich ablesen. Das Phänomen durfte aber nicht allein auf die Fehler bei der histometrischen Auswertung knochenarmer Präparate zurückgeführt werden, wie Abb. 1 implizieren könnte. In abgeschwächter Form fand sich die gleiche Tendenz in Abb. 2, wo die beiden chemischen Verfahren gegeneinander aufgetragen waren.

Auch die mathematisch-statistische Auswertung bestätigte den engen Zusammenhang der drei Untersuchungstechniken. Die fernsehtechnischen Analysendaten korrelierten sowohl mit der Atomabsorptionsspektralphotometrie ($r = .984$; $n = 51$) als auch mit der KOH-Auskochmethode ($r = .977$; $n = 48$) sehr eng. Bei der Interpretation war allerdings zu beachten, daß die große Spannweite der Ergebnisse die Abhängigkeit besonders deutlich in Erscheinung treten ließ. Weiterhin betrug das Verhältnis zwischen den histometrisch ermittelten Knochenanteilen und der AAS 1 : 1,8, während sich für den Microvideomat und die KOH-Auskochmethode eine Relation von 1 : 1,9 ergab.

Bei der linearen Regressionsanalyse stellte sich zwischen Histometrie (Y) und Atomabsorptionsspektralphotometrie (X) folgende Beziehung dar: $y = -0,0727 + 2,0722x$. Die entsprechende Gleichung lautete für das KOH-Auskochverfahren (X) als Referenzmethode: $y = -0,0063 + 2,0444x$. Daß die Regressionsgerade nicht durch den Nullpunkt läuft, dürfte auf methodischen Unzulänglichkeiten bei der Knochenbestimmung beruhen.

Der Zusammenhang von KOH-Auskochverfahren (Y) zu Atomabsorptionsspektralphotometrie (X) wurde durch folgende Gleichung wiedergegeben: $y = 0,0091 + 0,9666x$. Gleichzeitig errechnete sich ein Korrela-

tionskoeffizient von $r = .969$ ($n = 48$). Damit erscheint die Beziehung der automatischen Fernsehbildanalyse zu den einzelnen chemischen Verfahren nicht schlechter als die chemischen Methoden untereinander auszufallen.

4.4. Ergebnistabellen und Abbildungen

In den nachfolgenden Tabellen 4 und 5 werden die Ergebnisse der Paralleluntersuchungen zweier Stichproben (a/b) aus einer Bezugsgesamtheit aufgeführt. Neben den beiden Einzelwerten ist jeweils das arithmetische Mittel angegeben.

Tabelle 4

Mit Hilfe der AAS ermittelter Knochengehalt in der Feuchtsubstanz

Probe Nr.	Knochengehalt %	Probe Nr.	Knochengehalt %
1a	0,220	8a	0,207
1b	0,218	8b	0,201
$\bar{x}$	0,219	$\bar{x}$	0,204
2a	0,375	9a	0,295
2b	0,355	9b	0,304
$\bar{x}$	0,365	$\bar{x}$	0,2995
3a	0,377	10a	0,233
3b	0,344	10b	0,240
$\bar{x}$	0,3605	$\bar{x}$	0,2365
4a	0,239	11a	1,759
4b	0,240	11b	1,833
$\bar{x}$	0,2395	$\bar{x}$	1,796
5a	0,205	12a	1,119
5b	0,200	12b	1,205
$\bar{x}$	0,2025	$\bar{x}$	1,162
6a	0,192	13a	0,563
6b	0,191	13b	0,534
$\bar{x}$	0,1915	$\bar{x}$	0,5485
7a	0,265	14a	0,980
7b	0,271	14b	1,040
$\bar{x}$	0,268	$\bar{x}$	1,010

Fortsetzung

Tabelle 4

Probe Nr.	Knochengehalt %	Probe Nr.	Knochengehalt %
15a	0,572	25a	0,069
15b	0,536	25b	0,062
$\bar{x}$	0,554	$\bar{x}$	0,0665
16a	0,760	26a	0,049
16b	0,704	26b	0,051
$\bar{x}$	0,732	$\bar{x}$	0,050
17a	0,796	27a	0,064
17b	0,798	27b	0,069
$\bar{x}$	0,797	$\bar{x}$	0,0665
18a	0,597	28a	0,055
18b	0,600	28b	0,055
$\bar{x}$	0,5985	$\bar{x}$	0,055
19a	2,208	29a	0,073
19b	2,181	29b	0,079
$\bar{x}$	2,1945	$\bar{x}$	0,076
20a	0,138	30a	0,062
20b	0,176	30b	0,056
$\bar{x}$	0,157	$\bar{x}$	0,059
21a	2,184	31a	0,053
21b	2,315	31b	0,050
$\bar{x}$	2,2495	$\bar{x}$	0,0515
22a	1,378	32a	0,058
22b	1,433	32b	0,050
$\bar{x}$	1,4055	$\bar{x}$	0,054
23a	1,956	33a	0,048
23b	2,147	33b	0,050
$\bar{x}$	2,0515	$\bar{x}$	0,049
24a	0,253	34a	0,064
24b	0,253	34b	0,064
$\bar{x}$	0,253	$\bar{x}$	0,064

Fortsetzung

Tabelle 4

Probe Nr.	Knochengehalt %	Probe Nr.	Knochengehalt %
35a	0,010	45a	0,565
35b	0,011	45b	0,565
$\bar{x}$	0,0105	$\bar{x}$	0,565
36a	0,014	46a	0,513
36b	0,015	46b	0,513
$\bar{x}$	0,0145	$\bar{x}$	0,513
37a	0,017	47a	0,0475
37b	0,017	47b	0,0456
$\bar{x}$	0,017	$\bar{x}$	0,04655
38a	0,010	48a	0,0429
38b	0,017	48b	0,0419
$\bar{x}$	0,0135	$\bar{x}$	0,0424
39a	0,0015	49a	0,067
39b	0,0024	49b	0,066
$\bar{x}$	0,00195	$\bar{x}$	0,0665
40a	0,012	50a	0,0643
40b	0,011	50b	0,0548
$\bar{x}$	0,0115	$\bar{x}$	0,05955
41a	0,011	51a	0,0381
41b	0,014	51b	0,0436
$\bar{x}$	0,0125	$\bar{x}$	0,04085
42a	0,014		
42b	0,015		
$\bar{x}$	0,0145		
43a	0,0093		
43b	0,0094		
$\bar{x}$	0,00935		
44a	0,013		
44b	0,013		
$\bar{x}$	0,013		

Tabelle 5

Mit Hilfe der KOH - Auskochmethode ermittelter Knochengehalt
in der Feuchtsubstanz

Probe Nr.	Knochengehalt %	Probe Nr.	Knochengehalt %
1a	----	10a	0,310
1b	----	10b	0,313
$\bar{x}$	----	$\bar{x}$	0,3115
2a	0,287	11a	1,227
2b	0,289	11b	1,310
$\bar{x}$	0,288	$\bar{x}$	1,2685
3a	0,126	12a	1,144
3b	0,133	12b	1,231
$\bar{x}$	0,1295	$\bar{x}$	1,1875
4a	----	13a	0,265
4b	----	13b	0,303
$\bar{x}$	----	$\bar{x}$	0,284
5a	----	14a	0,530
5b	----	14b	0,709
$\bar{x}$	----	$\bar{x}$	0,6195
6a	0,311	15a	0,549
6b	0,387	15b	0,604
$\bar{x}$	0,349	$\bar{x}$	0,5765
7a	0,242	16a	0,427
7b	0,268	16b	0,482
$\bar{x}$	0,255	$\bar{x}$	0,4545
8a	0,226	17a	0,836
8b	0,210	17b	0,761
$\bar{x}$	0,218	$\bar{x}$	0,7985
9a	0,184	18a	0,460
9b	0,201	18b	0,439
$\bar{x}$	0,1925	$\bar{x}$	0,4495

Fortsetzung

Tabelle 5

Probe Nr.	Knochengehalt %	Probe Nr.	Knochengehalt %
19a	2,622	29a	0,053
19b	2,766	29b	0,053
$\bar{x}$	2,694	$\bar{x}$	0,053
20a	0,330	30a	0,067
20b	0,253	30b	0,063
$\bar{x}$	0,2915	$\bar{x}$	0,065
21a	2,443	31a	0,096
21b	2,385	31b	0,060
$\bar{x}$	2,414	$\bar{x}$	0,078
22a	1,233	32a	0,081
22b	1,319	32b	0,070
$\bar{x}$	1,276	$\bar{x}$	0,0755
23a	1,890	33a	0,093
23b	1,825	33b	0,075
$\bar{x}$	1,8575	$\bar{x}$	0,084
24a	0,307	34a	0,038
24b	0,321	34b	0,039
$\bar{x}$	0,314	$\bar{x}$	0,0385
25a	0,067	35a	0,009
25b	0,013	35b	0,002
$\bar{x}$	0,040	$\bar{x}$	0,0055
26a	0,063	36a	0,013
26b	0,079	36b	0,024
$\bar{x}$	0,071	$\bar{x}$	0,0185
27a	0,084	37a	0,022
27b	0,097	37b	0,021
$\bar{x}$	0,0905	$\bar{x}$	0,0215
28a	0,062	38a	0,029
28b	0,072	38b	0,014
$\bar{x}$	0,067	$\bar{x}$	0,0215

Fortsetzung

Tabelle 5

Probe Nr.	Knochengehalt %	Probe Nr.	Knochengehalt %
39a	0,022	49a	0,085
39b	0,022	49b	0,092
$\bar{x}$	0,022	$\bar{x}$	0,0885
40a	0,021	50a	0,076
40b	0,017	50b	0,068
$\bar{x}$	0,019	$\bar{x}$	0,072
41a	0,028	51a	0,052
41b	0,023	51b	0,073
$\bar{x}$	0,0255	$\bar{x}$	0,0625
42a	0,067		
42b	0,064		
$\bar{x}$	0,0655		
43a	0,051		
43b	0,017		
$\bar{x}$	0,034		
44a	0,036		
44b	0,033		
$\bar{x}$	0,0345		
45a	0,435		
45b	0,496		
$\bar{x}$	0,4655		
46a	0,399		
46b	0,322		
$\bar{x}$	0,3605		
47a	0,088		
47b	0,065		
$\bar{x}$	0,0765		
48a	0,059		
48b	0,063		
$\bar{x}$	0,061		

Die Tabelle 6 zeigt die Knochenflächenanteile (Vol.%) der Paralleluntersuchungen zweier Stichproben (a/b) aus einer Bezugsgesamtheit und die daraus gebildeten arithmetischen Mittelwerte ($\bar{x}$). Daneben wird die Anzahl der Meßbilder pro Schnitt aufgeführt.

Tabelle 6

Mit Hilfe der Fernsehbildanalyse ermittelte Knochenanteile

Probe Nr.	Flächenanteil Vol. %	Meßbilder pro Präparat n
1a	0,152	270
1b	0,134	234
$\bar{x}$	0,143	
2a	0,342	210
2b	0,412	156
$\bar{x}$	0,377	
3a	0,169	195
3b	0,305	208
$\bar{x}$	0,237	
4a	0,262	304
4b	0,231	238
$\bar{x}$	0,2465	
5a	0,505	255
5b	0,293	255
$\bar{x}$	0,399	
6a	0,888	256
6b	0,887	288
$\bar{x}$	0,8875	
7a	0,501	272
7b	0,789	289
$\bar{x}$	0,645	
8a	0,454	195
8b	0,460	208
$\bar{x}$	0,457	

Fortsetzung

Tabelle 6

Probe Nr.	Flächenanteil Vol. %	Meßbilder pro Präparat n
9a	0,433	272
9b	0,425	255
$\bar{x}$	0,429	
10a	0,638	224
10b	0,394	240
$\bar{x}$	0,516	
11a	4,113	252
11b	3,881	266
$\bar{x}$	3,997	
12a	2,264	340
12b	2,714	304
$\bar{x}$	2,489	
13a	0,761	306
13b	0,993	288
$\bar{x}$	0,887	
14a	1,640	272
14b	1,824	323
$\bar{x}$	1,732	
15a	0,996	288
15b	0,975	256
$\bar{x}$	0,9855	
16a	1,403	144
16b	1,561	144
$\bar{x}$	1,482	
17a	1,189	288
17b	1,177	342
$\bar{x}$	1,183	
18a	0,889	270
18b	0,854	252
$\bar{x}$	0,8715	

Fortsetzung

Tabelle 6

Probe Nr.	Flächenanteil Vol. %	Meßbilder pro Präparat n
19a	4,665	247
19b	5,295	285
$\bar{x}$	4,980	
20a	0,639	285
20b	0,332	280
$\bar{x}$	0,4855	
21a	4,578	272
21b	4,249	240
$\bar{x}$	4,4135	
22a	2,462	187
22b	2,411	156
$\bar{x}$	2,4365	
23a	4,560	182
23b	4,307	196
$\bar{x}$	4,4335	
24a	0,281	160
24b	0,144	210
$\bar{x}$	0,2125	
25a	0,019	240
25b	0,023	272
$\bar{x}$	0,021	
26a	0,009	196
26b	0,028	196
$\bar{x}$	0,0185	
27a	0,028	156
27b	0,008	168
$\bar{x}$	0,018	
28a	0,022	180
28b	0,025	210
$\bar{x}$	0,0235	

Fortsetzung

Tabelle 6

Probe Nr.	Flächenanteil Vol. %	Meßbilder pro Präparat n
29a	0,020	192
29b	0,038	192
$\bar{x}$	0,029	
30a	0,014	182
30b	0,038	182
$\bar{x}$	0,026	
31a	0,020	156
31b	0,035	182
$\bar{x}$	0,0275	
32a	0,019	195
32b	0,028	156
$\bar{x}$	0,0235	
33a	0,021	132
33b	0,074	144
$\bar{x}$	0,047	
34a	0,033	180
34b	0,067	180
$\bar{x}$	0,050	
35a	0,014	169
35b	0,019	143
$\bar{x}$	0,0165	
36a	0,026	144
36b	0,063	144
$\bar{x}$	0,0445	
37a	0,043	169
37b	0,020	169
$\bar{x}$	0,0315	
38a	0,007	143
38b	0,026	169
$\bar{x}$	0,0165	

Fortsetzung

Tabelle 6

Probe Nr.	Flächenanteil Vol. %	Meßbilder pro Präparat n
39a	0,017	132
39b	0,006	120
$\bar{x}$	0,0115	
40a	0,016	132
40b	0,076	110
$\bar{x}$	0,046	
41a	0,039	132
41b	0,062	132
$\bar{x}$	0,0505	
42a	0,044	110
42b	0,037	100
$\bar{x}$	0,0405	
43a	0,065	100
43b	0,054	110
$\bar{x}$	0,0595	
44a	0,080	121
44b	0,052	100
$\bar{x}$	0,066	
45a	0,696	252
45b	0,699	234
$\bar{x}$	0,6975	
46a	0,673	234
46b	0,594	238
$\bar{x}$	0,6335	
47a	0,240	192
47b	0,171	192
$\bar{x}$	0,2055	
48a	0,142	204
48b	0,166	221
$\bar{x}$	0,154	

Fortsetzung

Tabelle 6

Probe Nr.	Flächenanteil Vol. %	Meßbilder pro Präparat n
49a	0,267	221
49b	0,303	180
$\bar{x}$	0,285	
50a	0,265	180
50b	0,282	180
$\bar{x}$	0,2735	
51a	0,096	247
51b	0,075	285
$\bar{x}$	0,0855	

Tabelle 7

Vergleich der durchschnittlichen Knochengehalte in flüssigem Fleischhomogenat (FFH) und den daraus hergestellten Wurstprodukten im Spiegel der einzelnen Nachweismethoden

Probe Verfahren	FFH n=10	10%iger Zusatz n=10	5%iger Zusatz n=10
AAS	0,256 ± 0,06	0,059 ± 0,009	0,012 ± 0,004
KOH-Ausko- chver- fahren	0,249 ^x ± 0,075	0,066 ± 0,018	0,027 ± 0,015
Microvideomat	0,434 ± 0,216	0,028 ± 0,011	0,038 ^{xx} ± 0,019

^x
n = 7

^{xx} Das mit dem Microvideomat ermittelte Ergebnis für Brühwürste mit 5%igem FFH-Zusatz wurde nur vollständigkeitshalber hier aufgeführt, da der Untersuchungsablauf für diese Produkte erheblich von der Probenauswahl abwich.

Tabelle 8

Knochenpartikelgrößenanalyse mit Hilfe des Microvideomaten

In dieser Tabelle sind die Knochengrößenangaben für die einzelnen Paralleluntersuchungen und der arithmetische Mittelwert angegeben.

Probe Nr.	Durchschnittliche Partikelgröße μm^2	Probe Nr.	Durchschnittliche Partikelgröße μm^2
1a	429	9a	248
1b	132	9b	216
$\bar{x}$	280,5	$\bar{x}$	232
2a	262	10a	271
2b	202	10b	372
$\bar{x}$	232	$\bar{x}$	321,5
3a	215	11a	802
3b	729	11b	627
$\bar{x}$	472	$\bar{x}$	714,5
4a	527	12a	1953
4b	430	12b	2047
$\bar{x}$	478,5	$\bar{x}$	2013,5
5a	331	13a	2136
5b	255	13b	3043
$\bar{x}$	293	$\bar{x}$	2589,5
6a	219	14a	2150
6b	170	14b	2437
$\bar{x}$	194,5	$\bar{x}$	2293,5
7a	249	15a	1847
7b	269	15b	1875
$\bar{x}$	259	$\bar{x}$	1861
8a	289	16a	2991
8b	330	16b	2746
$\bar{x}$	309,5	$\bar{x}$	2868,5

Fortsetzung

Tabelle 8

Probe	Durchschnittliche Partikelgröße	Probe	Durchschnittliche Partikelgröße
Nr.	μm^2	Nr.	μm^2
17a	895	27a	333
17b	2887	27b	78
$\bar{x}$	1891	$\bar{x}$	206
18a	355	28a	312
18b	758	28b	198
$\bar{x}$	556,5	$\bar{x}$	255
19a	1135	29a	180
19b	870	29b	137
$\bar{x}$	1002,5	$\bar{x}$	158,5
20a	459	30a	75
20b	322	30b	226
$\bar{x}$	390,5	$\bar{x}$	150,5
21a	662	31a	94
21b	933	31b	237
$\bar{x}$	797,5	$\bar{x}$	165,5
22a	2240	32a	120
22b	2122	32b	284
$\bar{x}$	2181	$\bar{x}$	202
23a	714	33a	244
23b	669	33b	556
$\bar{x}$	691,5	$\bar{x}$	400
24a	1007	34a	215
24b	849	34b	578
$\bar{x}$	928	$\bar{x}$	396,5
25a	224	35a	42
25b	214	35b	46
$\bar{x}$	219	$\bar{x}$	44
26a	133	36a	103
26b	289	36b	95
$\bar{x}$	211	$\bar{x}$	99

Fortsetzung

Tabelle 8

Probe	Durchschnittliche Partikelgröße	Probe	Durchschnittliche Partikelgröße
Nr.	$\mu \text{ m}^2$	Nr.	$\mu \text{ m}^2$
37a	112	46a	2230
37b	103	46b	1262
$\bar{x}$	107,5	$\bar{x}$	1746
38a	67	47a	1452
38b	133	47b	1078
$\bar{x}$	100	$\bar{x}$	1265
39a	185	48a	573
39b	70	48b	898
$\bar{x}$	127,5	$\bar{x}$	735,5
40a	133	49a	557
40b	206	49b	637
$\bar{x}$	169,5	$\bar{x}$	597
41a	149	50a	3632
41b	295	50b	2335
$\bar{x}$	222	$\bar{x}$	2983,5
42a	172	51a	438
42b	119	51b	437
$\bar{x}$	145,5	$\bar{x}$	437,5
43a	273		
43b	266		
$\bar{x}$	269,5		
44a	267		
44b	193		
$\bar{x}$	230		
45a	1013		
45b	616		
$\bar{x}$	814,5		

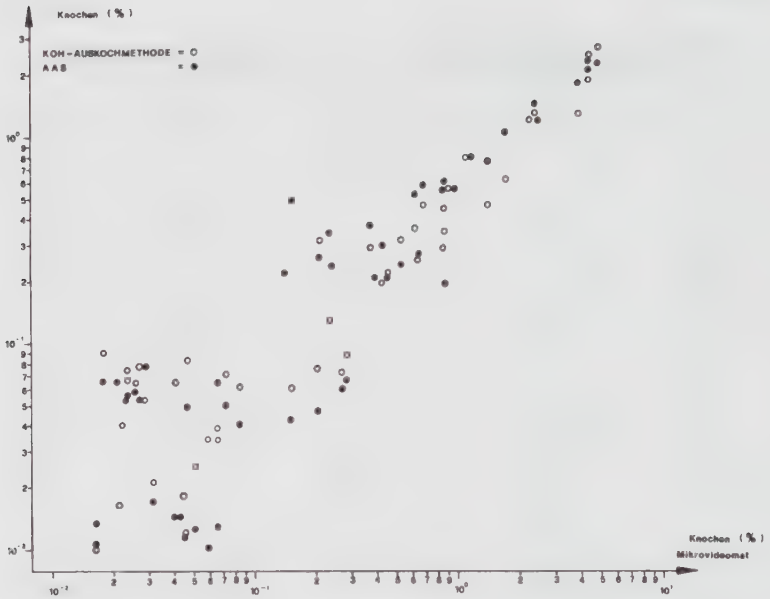


Abb. 1: Beziehung zwischen den histometrisch (Micro-Videomat) und den chemisch (AAS) bzw. chemisch-physikalisch (KOH-Auskoachverfahren) ermittelten Knochengehalten

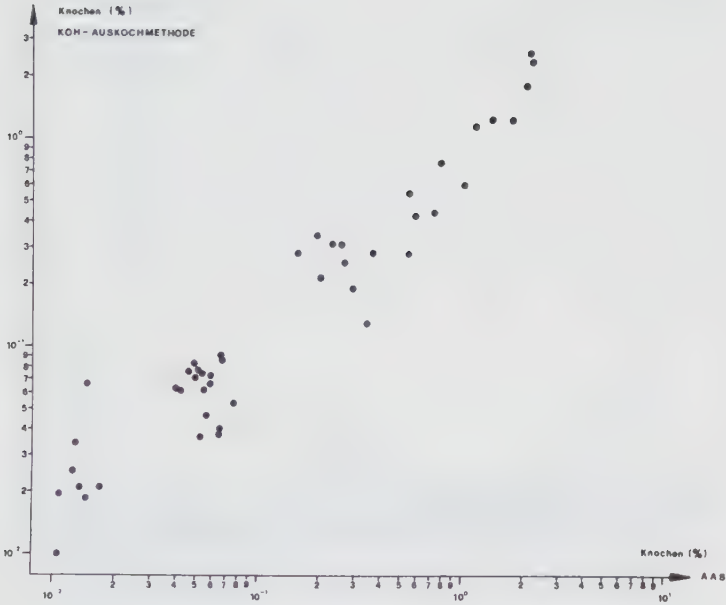


Abb. 2: Beziehung zwischen den Resultaten der AAS und des KOH-Auskoichverfahrens

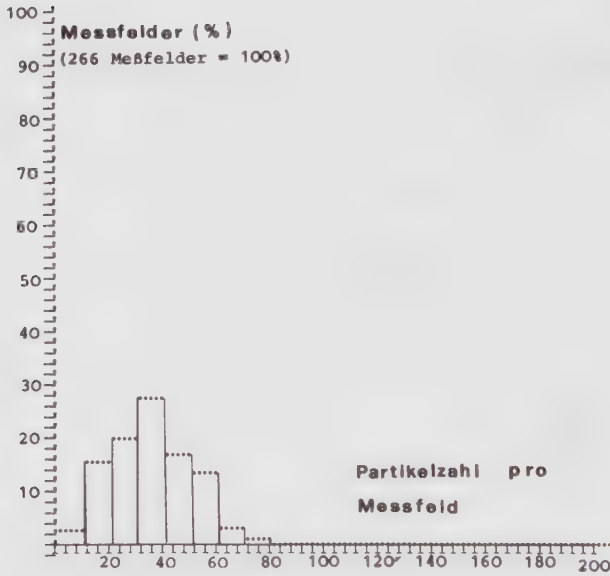


Abb. 3: Häufigkeitsverteilung (Computerausdruck) der Knochenpartikelzahl des Präparates Nr. 11 b

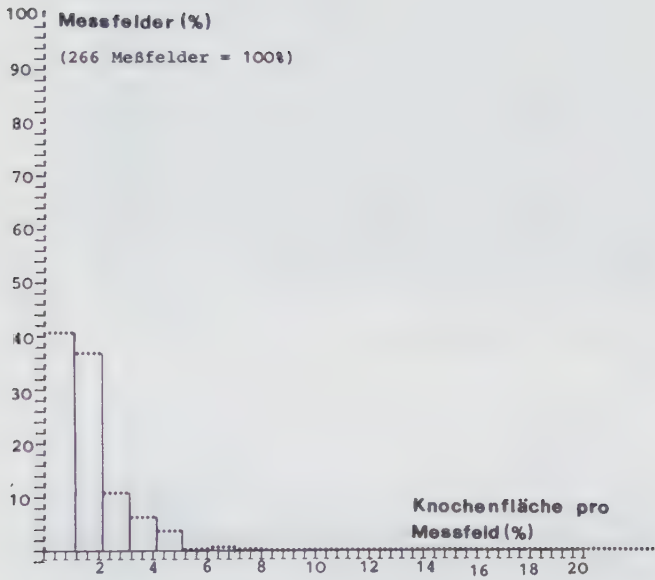


Abb. 4: Häufigkeitsverteilung (Computerausdruck) der absoluten Knochenflächenangaben des Präparates Nr. 11 b

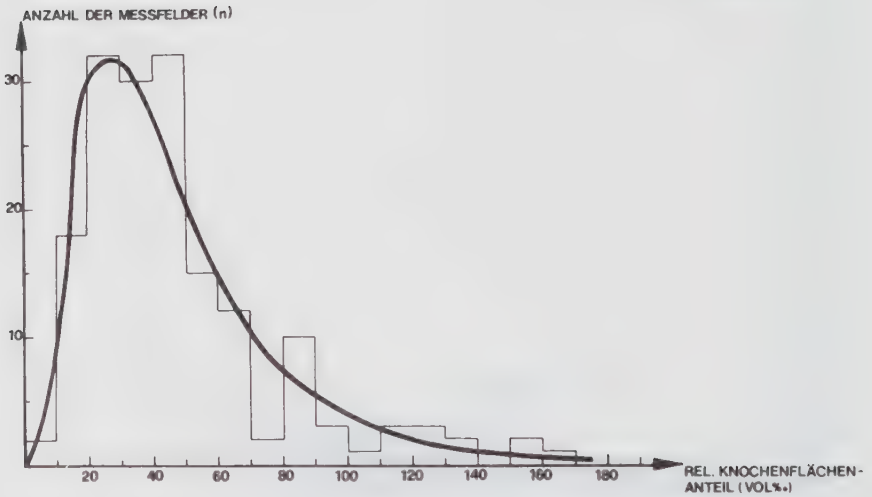


Abb. 5: Gegenüberstellung einer empirischen Häufigkeitsverteilung des relativen Knochenflächenanteiles (Präparat Nr. 23 a) mit der theoretisch zu erwartenden logarithmischen Normalverteilungskurve

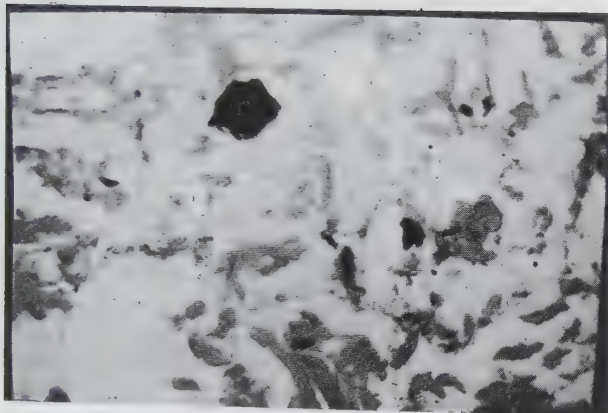


Abb. 6: Undiskriminiertes Monitorbild eines knochenhaltigen Separatorfleischpräparates (Vergrößerung 1 : 7,875)

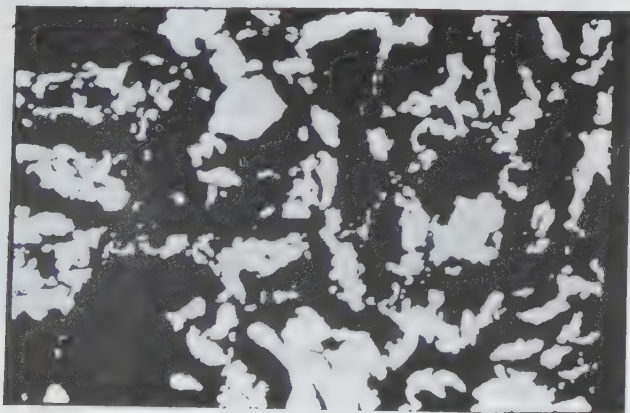


Abb. 7: Messung des Gesamtgewebes bei entsprechender Filter- und Diskriminatorstellung (Präparatausschnitt wie Abb. 6)



Abb. 8: Messung des Knochengewebes bei entsprechender Filter- und Diskriminatorstellung (Präparatauschnitt wie Abb. 6)

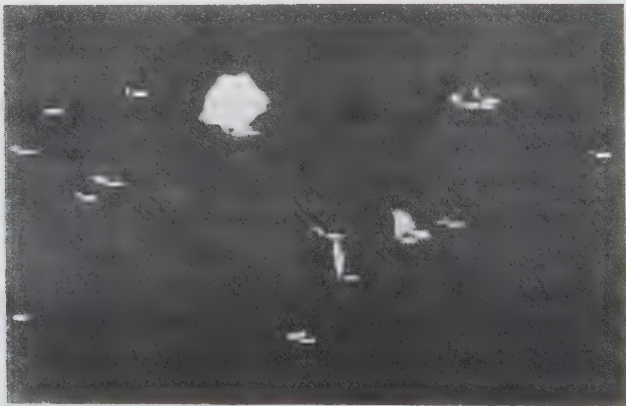


Abb. 9: Bestimmung der Knochenpartikelzahl (Einstellung wie in Abb. 8) durch Markierung der Partikel. Zur Darstellung zerklüfteter Knochenteilchen wird eine Korrektur durchgeführt, die automatisch gewählt werden kann. Dadurch ist eine mehrfache Markierung einzelner Partikel gegeben.

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die bisher publizierten Daten zur Beschaffenheit von Separatorfleisch basieren hauptsächlich auf chemischen oder chemisch-physikalischen Methoden des Knochennachweises. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde bei den vorliegenden Versuchen sowohl der Calciumgehalt als auch der gravimetrische Knochenascheanteil parallel bestimmt. Aufgrund des hohen Informationsgehaltes histometrischer Verfahren erschien es gerechtfertigt, zusätzlich die automatische Fernsehbildanalyse auf ihre Brauchbarkeit hin zu überprüfen.

Die Präzision (Wiederholbarkeit) der drei Verfahren wurde anhand der statistischen Auswertung von Parallelbestimmungen beurteilt. Die Richtigkeit (exakte quantitative Erfassung der tatsächlich im Untersuchungsmaterial vorliegenden Mengen (SACHS, 1968)) konnte dagegen nur indirekt überprüft werden, da kein Modellversuch mit bekannten Knochenbeimischungen durchgeführt wurde. Aus der Gegenüberstellung der einzelnen Mittelwerte ergaben sich aber Anhaltspunkte bezüglich der Übereinstimmung und Plausibilität der Ergebnisse.

5.1. Atomabsorptionsspektralphotometrie (AAS)

Der Ermittlung des Calciumgehaltes einer Probe durch die AAS wird ein hohes Maß an Spezifität, Selektivität und Störfreiheit zugeschrieben (WELZ, 1972). Eine Reihe von Untersuchern bediente sich dieses Verfahrens, um den Knochengehalt in Fleisch und Fleischerzeugnissen zu ermitteln.

Bei den vorliegenden Ergebnissen der AAS zeigen sich gute Übereinstimmungen zwischen den Paralleluntersuchungen. Bei 20 Proben differieren die Doppelbestimmungen um weniger als 0,002 %. Damit scheinen sich die verschiedenen Fehlermöglichkeiten bei der Einwaage und

der Verdünnung des Probenmaterials kaum auf die Präzision des Verfahrens auszuwirken. Daß Brühwurst mit 10 %iger FFH-Beimischung (Flüssiges Fleischhomogenat) unerwartet viel Knochen im Vergleich zum reinen FFH enthält, dürfte kaum auf einem Rezeptfehler beruhen. Vielmehr wäre zunächst der Analysengang kritisch zu betrachten und speziell die Richtigkeit des Blindwertes zu überprüfen.

Für den Calciumgehalt in knochenfreiem Muskelfleisch wird von den meisten Untersuchern eine Konstante von 0,015 % Ca veranschlagt, die auf Untersuchungen von BAKER (1974) basiert. Der Faktor gilt sowohl für Geflügel- als auch für Rind- und Schweinefleisch (GRUNDEN u. MAC NEIL, 1973; TÄNDLER, 1975 b).

Größere Schwierigkeiten treten jedoch bei der Ermittlung eines Calciumblindwertes für Fleischerzeugnisse auf, weil hier weitere Ca-Anteile durch die Verwendung von Gewürzen bzw. die Verarbeitung von Milcheiweiß zugeführt werden können. Aufgeschlossenes Milcheiweiß enthält nach PFAFF (1974) 0,75 % Calcium. Bei einem Zusatz von max. 2 % aufgeschlossenem Milcheiweiß gemäß der Anlage 2 der Fleisch-VO (bezogen auf die Fleisch- und Fettmenge) würde sich der Ca-Anteil um weitere 0,015 % erhöhen. Da aber der tatsächliche Milcheiweißzusatz im Einzelfall nicht bekannt ist und auch nicht der Pflicht zur Kenntlichmachung unterliegt, würde bei Erzeugnissen mit diesem Zusatz stets eine quantitative Milcheiweißbestimmung erforderlich werden, um den Knochen calciumgehalt errechnen zu können.

In der vorliegenden Arbeit basieren die Knochenberechnungen bei den Brühwürsten auf einem Blindwert von 0,0098 % Ca, der aus Analysenergebnissen von 8 milcheiweißfreien und knochenfreien Proben ermittelt wurde.

Kritisch müssen auch die BAKER'schen Umrechnungsfaktoren betrachtet werden, die erst den Rückschluß vom Ca-Anteil auf den Gesamtknochen erlauben und in den USA zu Berechnung der Knochenmenge dienen. Die Anwendung solcher Faktoren setzt jedoch die genaue Kenntnis der zum Separieren verwendeten Knochen und ihres spezifischen Calciumgehaltes voraus (BRÜNING-ÜLTJEN, 1977). In der Routineüberwachung ist diese Information aber praktisch niemals zu erhalten.

Gegenüber der Fernsehbildauswertung ist der gesamte Meßvorgang der Sichtkontrolle entzogen, wodurch manche Fehlerquellen nur schwer aufgefunden und beseitigt werden können. Dennoch bezeichnete HUJNAKOVA (1976) die AAS als die beste Methode zum quantitativen Nachweis von Knochenbestandteilen im Separatorenfleisch. Vorbehaltlich der oben vorgebrachten Einwände gegen die "Richtigkeit" arbeitet das Verfahren tatsächlich sehr präzise ("genau"), wie die eigenen Untersuchungen bestätigten.

5.2. KOH-Auskochverfahren

Auch die KOH-Auskochmethode als Beispiel eines direkten Verfahrens zum Knochennachweis zeigte eine relativ gute Übereinstimmung der Doppelproben, obwohl die Abweichungen der einzelnen Parallelmessungen etwas größer als bei der AAS ausfielen. Bei Betrachtung der Meßwerte wird jedoch ersichtlich, daß bei einem Knochengehalt unter 0,1 % die mit dem KOH-Verfahren ermittelten Werte nahezu regelmäßig über den aufgrund der Ca-Bestimmung errechneten Daten liegen. Oberhalb der 0,1 % Grenze besteht diese Tendenz nicht mehr, wie Abb. 2 verdeutlicht.

Zur Erklärung dieses Phänomens könnten mögliche Differenzen bei der Blindwertermittlung herangezogen werden, die ihrerseits auf der zunehmenden Verwendung

flüssiger Gewürzmischungen beruhen können. Derartige Extrakte dürften im Ascherückstand kaum nachweisbar sein, während sie von erheblich sensibleren Methoden, wie der AAS, noch erfaßt werden. Sind korpuskuläre Gewürze durch flüssige Gewürzmischungen ersetzt worden, so bleibt zwar der Blindwert bei der AAS konstant, bei der KOH-Auskochmethode sinkt er dagegen deutlich ab. Für das Veraschungsverfahren besteht folglich das Problem, im konkreten Einzelfall den richtigen Blindwert zu finden. Diese methodische Unsicherheit macht sich bei Proben mit geringem Knochenanteil besonders bemerkbar.

Bezogen auf den Knochengehalt des FFH fallen die separatorfleischhaltigen Brühwürste durch etwas verzerrte Analysenergebnisse auf. Zwar verringern sich die Werte um eine Zehnerpotenz, doch liegen sie bei 10- und 5 %igem FFH-Zusatz doppelt so hoch, wie es aufgrund des Ausgangsmaterials zu erwarten wäre. Zur Festlegung des Blindwertes wurden die gleichen Referenzproben wie für die AAS benutzt. Der ermittelte Blindwert von 0,28 % (bezogen auf die fettfreie Trockensubstanz) liegt in dem von DILLER (1941) und SINELL (1956 a) angegebenen Bereich. Dennoch stellt sich die Frage, ob die Brühwurstblindwerte auf die Analysendaten der FFH-haltigen Proben ohne weiteres übertragen werden dürfen.

Weiterhin ist zu bedenken, daß das KOH-Verfahren aufgrund der vielen Untersuchungsschritte (Wiegen, Kochen, Zentrifugieren, Glühen) für methodische Fehler recht anfällig ist. Insbesondere das Übertragen des getrockneten Zentrifugates bereitete erhebliche Schwierigkeiten, weil sich das Sediment nicht immer vollständig von der Glaswandung ablöste. Daß es sich bei dem im Tiegel befindlichen Rückstand tatsächlich nur um Knochen handelte, konnte durch eine Silbernitratfär-

bung der ausgeglühten Partikel überprüft werden. Des gleichen Prinzips bediente sich ANHALT (1974) zur Kontrolle des Sedimentierverfahrens.

Der Nachweis von Knochenbeimischungen über den Gehalt an Knochenasche (SINELL, 1956 a) wurde als zuverlässig bezeichnet (ARNETH, 1977). Auch dem KOH-Verfahren von GERATS u. TERBIJHE (1975) und dem Sedimentierverfahren von SCHAAL u. ANHALT (1974) wurde eine ausreichende Genauigkeit zugeschrieben (SCHULZE, 1977).

Wie bei der indirekten Knochenbestimmung liegen die größten Schwierigkeiten all dieser Methoden zum direkten Nachweis offensichtlich in der Umrechnung der ermittelten Analysenwerte in "Knochennormalsubstanz". In Modellversuchen läßt sich dieses Problem weitgehend mit Hilfe von Eichkurven lösen (ANHALT, 1974; SCHULZE, 1977).

Andere Autoren bestimmten den versuchsbedingten Substanzverlust des Knochenmaterials und schlossen die entsprechenden Werte in die Berechnungsgrundlage ein (GERATS u. TERBIJHE, 1975; LINKE, 1974; SINELL, 1956 a).

Um dieses Problem zu umgehen, schlug SCHULZE (1977) vor, generell von einer Umrechnung in Frischknochen abzusehen. Damit fand die Anregung von ARNETH et al. (1975) Unterstützung, nach der als Beurteilungsbasis kein hypothetischer Feuchtknochengehalt, sondern der analytisch nachweisbare Knochenascheanteil dienen sollte.

5.3. Fernsehbildanalyse

Im Gegensatz zu den direkten und indirekten chemischen Methoden gestattet es das histologische Untersuchungsverfahren, die Häufigkeit und Verteilung der Knochenpartikel unmittelbar darzustellen. Voraussetzung hierfür bildet eine Färbetechnik, die kalkhaltiges Gewebe

selektiv erfaßt. Im Gegensatz zu den beiden vorgenannten gravimetrischen Methoden basiert das histometrische Verfahren auf der Volumetrie der einzelnen Gewebskomponenten. Diese Ergebnisse sind daher prinzipiell verschieden von denen der ersteren Methoden und nicht ohne weiteres vergleichbar, wie später noch ausgeführt wird.

Bei der Anwendung der CALLEJA-Färbung (1897) lassen sich zwar die Knochenteilchen mit dem menschlichen Auge strukturell und auch farblich differenzieren, doch reicht der Helligkeitskontrast zwischen den Komponenten zur automatischen Analyse mit Hilfe des Micro-Videomaten nicht aus. Der gleiche Einwand gilt für die zur Knochendarstellung entwickelte Trichromfärbung mit Pikrinsäure-Alizarin S-Indigocarmin (PFEIFFER et al., 1975). Beide Rezepturen können zwar zur quantitativen Bestimmung mit Hilfe manueller Verfahren (Streckensummier- und Punktezählmethode) durchaus empfohlen werden, für die Auswertung mit der Fernsehbildanalyse eignet sich dagegen die Silbernitratimprägnierung weit besser, wie die vorliegenden Ergebnisse beweisen.

Allerdings wurde die quantitative Auswertung knochenhaltiger Präparate von WENZEL et al. (1974) mit der Begründung abgelehnt, bei der Herstellung der Schnitte löse sich ein erheblicher Anteil des Knochens heraus. Diesen Einwand relativierten aber PFEIFFER et al. (1975) insoweit, als bis zu einem Teilchendurchmesser von 0,4 mm Partikelverluste beim Schneiden nicht zu befürchten seien, vorausgesetzt das Material ist gut gebunden.

In diesem Zusammenhang sind Erhebungen von FIELD et al. (1977) zu erwähnen. Sie zeigten, daß die Knochenpartikel im Separatorfleisch einen mittleren Durch-

messer von 76,6 bis 111,7 μ m besaßen und damit weit unter dem genannten kritischen Durchmesser von 0,4 mm lagen.

Größere Teilchen sind auch kaum zu erwarten, weil nur Zylinderbohrungen unter 0,635 mm als unbedenklich für die Produktion erachtet wurden (FIELD et al., 1974 a).

Auch in den vorliegenden Untersuchungen lösten sich Knochenpartikel während des Gefrierschneidens nur bei Verwendung stumpfer Mikrotommesser aus der Probe. Ein Substanzverlust im Verlaufe des Färbevorganges konnte durch die von BENTLER (1968) empfehlende und geringfügig modifizierte Kollodiumbehandlung gänzlich vermieden werden. Aus diesem Grunde erscheint es nicht berechtigt, der histometrischen Technik, die bereits von LINKE u. THUMSER (1964) sowie HILDEBRANDT et al. (1975) zur Bestimmung des Knochenanteiles eingesetzt wurde, die Eignung für einen quantitativen Nachweis abzuspreehen.

Die Ergebnisse der Paralleluntersuchungen stimmen bei der histometrischen Technik nicht so gut wie bei den chemischen Verfahren überein. Hierfür mag die geringe Homogenität innerhalb eines Schnittes verantwortlich sein, aus der ein erheblicher Stichprobenfehler resultiert. Es bedarf daher einer Erklärung, warum zwischen den Meßfeldern eines Präparates offensichtlich sehr große Streuungen bestehen. Die Antwort ergibt sich aus der Art der Probenziehung und -aufbereitung. Im Gegensatz zu den chemischen Methoden, bei welchen relativ viel Material eingewogen wird, gelangt im Rahmen histometrischer Analysen ein sehr geringer Teil des Probengutes zur Untersuchung. Bei einer Kantlänge von 2 x 2 cm sowie einer Höhe von 14 μ m besitzt der Probenkörper ein außerordentlich kleines Volumen. Gerade wegen der geringen Masse können aus ei-

nem Schnitt nicht genug Stichproben (= Meßfelder) ausgewertet werden, um ein repräsentatives Abbild der recht heterogen strukturierten Grundgesamtheit zu erhalten. Die Verzerrungen einer unzureichenden Durchmischung gleichen sich erst durch Untersuchung mehrerer Präparate aus. Wieviele Schnitte gemessen werden müßten, wäre im konkreten Einzelfall immer wieder neu zu entscheiden.

Wird ein Erzeugnis mit weniger als 0,1 % Knochen histologisch aufbereitet, so ist die Wahrscheinlichkeit, daß jedes einzelne Präparat (durchschnittlich 400 mm^2) eine repräsentative Anzahl von Knochenpartikeln enthält, nicht mehr sehr groß. Weitere Ungenauigkeiten resultierten aus der vorliegenden Versuchsanordnung, bei der Schnitte mit 5 %igem FFH-Zusatz nicht zufällig, sondern nach dem Färberesultat für die histometrische Analyse ausgesucht worden sind.

In der Qualitätskontrolle hängt der erforderliche Prüfaufwand von vier Faktoren ab: der Richtigkeit der Parameterschätzung, der Größe der Standardabweichung zwischen den Probeneinheiten in der Partie, der Größe der Standardabweichung der analytischen Methode sowie den Kosten der Durchführung.

So stellt sich bei der geringen Größenordnung des Knochengehaltes in Fleischerzeugnissen die Frage, ob die Auswertung von zwei Präparaten zur Beurteilung überhaupt genügt. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Paralleluntersuchungen und der geringe methodische Fehler, daß sich zumeist die Entscheidung einer Grenzwertüber- oder-unterschreitung noch absichern läßt. Bei den Produkten mit $\geq 0,5$ % Knochengehalt reicht sogar der Informationsgehalt eines einzigen Schnittes aus, um eine gesicherte Überschreitung des Grenzwertvorschlages ($\geq 0,1$ % Knochen) zu belegen.

Weiterhin ist bei der Interpretation histometrischer Daten zu beachten, daß der Rückschluß vom Flächenanteil eines zweidimensionalen mikroskopischen Bildes auf den Gesamtinhalt nur unter bestimmten Voraussetzungen erfolgen darf. Der Anteil einzelner Komponentenflächen kann dem entsprechenden Volumenverhältnis erst dann gleichgesetzt werden, wenn die Partikelgröße der zu bestimmenden Komponente die Schnittdicke wesentlich übersteigt (HOLMES, 1927; HENNIG, 1957 a). Das ist normalerweise bei der histologischen Lebensmitteluntersuchung der Fall. Sinkt dagegen die Partikelabmessung unter die Schnitthöhe ab, wird das morphometrisch ermittelte Volumen größer als es der Wirklichkeit an der zerlegten Struktur entspricht. Dabei nimmt der Fehler mit der Präparatdicke und dem Zerkleinerungsgrad prinzipiell zu.

HENNIG (1957 a) erläuterte bei der Volumenbestimmung kugeligter Körper in einem Präparat, daß ein Schätzfehler dann ohne größere Bedeutung sei, wenn die Schnittdicke gegenüber den Abmessungen der zu untersuchenden Körper klein gehalten wird. Ist jedoch die Schnittdicke doppelt so groß wie der Partikeldurchmesser, so beträgt das wirkliche Volumen nur $1/4$ des errechneten.

Neben dem absoluten Körpervolumen beeinflusst auch der Formfaktor das Verhältnis zwischen wahren und gemessenem Volumen (FISCHERMEISTER, 1974). Für die Gestaltanalyse pleomorpher Objekte, zu denen sicherlich größere Knochenpartikel gehören, bestehen allerdings noch keine mathematischen Verfahren (ELIAS, 1971). Dennoch läßt sich ein Verhältnis zwischen realem und ermitteltem Volumen von mindestens 1 : 2 abschätzen. In dieser Relation bleibt eine Überbewertung des Gesamtgewebes, die ebenfalls zu erwarten ist, unberücksichtigt.

Bei der Histometrie besteht neben der Ermittlung des Volumenanteils auch die Möglichkeit, die Partikelgröße zu vergleichen. Für die Qualitätsbeurteilung ist das ein besonders wichtiger Umstand. Bei der morphometrischen Bestimmung des Partikeldurchmessers bestehen aber ähnliche Probleme wie bei der Erfassung der Volumina. Aus den anteiligen Schnittflächen resultieren theoretisch immer dann wahrheitsgetreue Ermittlungen der Größenverhältnisse, wenn die Präparatdicke und der Teilchendurchmesser deutlich differieren. So könnten bei der üblichen Schnittdicke von $10\text{ }\mu\text{ m}$ gröbere Schätzfehler nur vermieden werden, wenn überwiegend angeschnittene (Partikeldurchmesser $> 100\text{ }\mu\text{ m}$) oder projizierte (Partikeldurchmesser $< 1\text{ }\mu\text{ m}$) Meßobjekte vorliegen (HENNIG, 1956; HENNIG, 1957 b). Beide Möglichkeiten stehen jedoch für die lichtmikroskopische Technik und damit auch für die Fernsehbildanalyse kaum offen.

Für den Fall, daß die Partikel größer als die Schnittdicke sind, stellt sich das sog. "Tomatensalatproblem". Es bezeichnet die Beziehung zwischen der Größenverteilung von Kugeln in einer durchsichtigen Einbettungsmasse und der sich bei einem Schnitt durch diese Masse ergebenden Größenverteilung. Es sind einige Gleichungen entwickelt worden, mit deren Hilfe aus Mittelwert und Standardabweichung der Schnittkreisradien sich der Mittelwert und die Standardabweichung der Kugelradien berechnen lassen (BACH, 1956; LENZ, 1955). Solche Formeln gelten zwar nur für idealisierte Modelle, sie können aber auch als Orientierungshilfe zur allgemeinen Befundauswertung dienen.

Unter den genannten Vorbehalten ergibt sich bei den eigenen Untersuchungen für den mittleren Knochenpartikeldurchmesser aller 51 Proben in grober Näherung ein Wert von etwa $20\text{ }\mu\text{ m}$. Dieser errechnete mittlere

Partikeldurchmesser kann als realistisch angesehen werden, da ERNST (1974) in seinen Untersuchungen die Partikelgröße mit einem arithmetischen Mittelwert von $50 \mu m$ angab. Da die von ihm untersuchten Produkte Knochengehalte von ca. 13 Vol. % aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, daß die Separationsanlagen mit großen Zylinderbohrungen und einer hohen Ausbeute betrieben wurden. Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten nur Knochengehalte bis max. 4,9 Vol. % gemessen werden, was auf eine Apparatereinstellung mit geringer Ausbeute schließen läßt, wodurch auch die Größe der Knochenpartikel vermindert würde.

Für das Verständnis morphometrischer Meßdaten ist es nicht nur bedeutsam, daß durch die einseitige Verzerrung bei der Reduktion von Körpern auf ihre Projektionsfläche der Komponentengehalt überschätzt und die Teilchengröße unterschätzt wird. Darüberhinaus sollte auch die Häufigkeitsverteilung der wichtigsten Merkmale Beachtung finden. Während die Knochenpartikelzahl/Meßfeld in den einzelnen Präparaten ein symmetrisches Polygon aufweist, zeigt die Knochenfläche/Meßfeld einen linkssteilen Kurvenzug (Abb. 3 und 4). Die systematische Verschiebung spricht für einen hohen Anteil kleiner und kleinster Partikel. Durch Einwirken mechanischer Kräfte bei der Herstellung und Verarbeitung entsteht wahrscheinlich dieser Knochen-gries, indem einzelne Teilchen aus größeren Knochen-splittern abgesprengt oder abgerieben werden.

Bei der Restfleischgewinnung variiert die Teilchengröße je nach Einstellung des Separators sowie der angestrebten Ausbeute erheblich. Der Knochenpartikeldurchmesser ist jedoch beschränkt durch die Zylinderbohrungen der einzelnen Maschinen. Ebenso ist der Knochengehalt von den entsprechenden Einstellungen abhängig, die jeweils auf einen bestimmten Komponen-

tenanteil schließen lassen. Im verzehrsfertigen Erzeugnis kann die Knochenbeimischung durch Rezepturmodifikation hinreichend gesteuert werden. Die Partikelabmessung ist dagegen im weiteren Produktionsablauf kaum noch zu beeinflussen und entzieht sich darüberhinaus der innerbetrieblichen Kontrolle. Um so notwendiger ist es, nicht nur den Knochengehalt zu ermitteln, sondern auch die Bestimmung der Knochenteilchengröße in die Überwachung einzubeziehen, zumal grobe Partikel eine "nicht unerhebliche Minderung des Genußwertes" gemäß § 17 Abs. 1 Nr. 2 b LMBG darstellen und auch in gesundheitlicher Beziehung möglicherweise nicht völlig unbedenklich sind.

Nach den Angaben aus der Literatur und aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint sich für die durchschnittliche Teilchengröße ein Wert von $100\text{ }\mu\text{m}$ von technologischer Seite her ohne weiteres einhalten zu lassen.

5.4. Gegenüberstellung der Ergebnisse

Offensichtlich sind die Ergebnisse der histometrischen Analyse nicht direkt mit den beiden chemischen Methoden vergleichbar. Der wichtigste Unterschied zwischen den Verfahren besteht in den differierenden Bezugsgrößen. Die chemisch-analytischen Verfahren beziehen Asche oder Calcium als Knochenäquivalente auf Feuchtsubstanzgewicht. Die Histometrie bezieht direkt dargestellte Knochenpartikel (-flächen oder -volumina) auf tinktoriell dargestellte Gesamtsubstanz (-flächen oder -volumina). Beide Angaben könnten mit Kenntnis des spezifischen Gewichtes ineinander umgerechnet werden. Eine solche Transformation ist aber praktisch kaum möglich, da weitere Faktoren - wie Zerkleinerungsgrad und Abtrocknung - die Gewicht/Volumen-Relation zusätzlich beeinflussen. Die Schwierigkeiten

bei einem Vergleich chemisch-analytischer mit histometrischen Daten fanden auch in der Literatur Niederschlag (KOTTER u. PRÄNDL, 1958; KOTTER, 1964; LIENHOP, 1960; LINKE u. FLEISCHMANN, 1964; LINKE, 1971; PROST et al., 1975).

Trotz der völlig unterschiedlichen Analysengänge und Bezugsgrößen korrelieren die Ergebnisse der direkten und indirekten Verfahren zum quantitativen Knochenachweis sehr eng miteinander. Damit können alle drei überprüften Methoden für die Überwachungspraxis empfohlen werden. Unabhängig von der Genauigkeit des einzelnen Verfahrens läßt sich in jedem Fall das Überschreiten eines Wertes von 0,1 % bzw. 0,2 %, die als Grenze für die chemisch ermittelten Knochenbestandteile vorgeschlagen worden sind (ARNETH et al., 1975; LINKE et al., 1974; SCHULZE, 1977; SOMMER u. MÜLDER, 1975; TÄNDLER, 1975 b), sicher und reproduzierbar erfassen. Diese Limitierungen können auch mit der Fernsehbildanalyse ebenso zuverlässig überwacht werden.

Auf der Suche nach dem optimalen Untersuchungsverfahren ist keine allgemeingültige Entscheidung möglich, weil verschiedene, z. T. gegensätzliche Faktoren berücksichtigt werden müssen. Die AAS besitzt zwar die höchste Präzision, erfordert jedoch die Anschaffung eines recht teuren Gerätes. Für das weniger exakte Laugenverfahren bildet der relativ hohe Zeit- und Personalaufwand den größten Nachteil.

Die histometrische Technik stellt sich besonders in Bezug auf die Investitionskosten als recht ungünstig dar. Dem steht als Vorzug gegenüber, daß sie im Gegensatz zu den chemischen Verfahren das Knochengewebe direkt erfaßt und keiner fragwürdigen Umrechnung auf "Knochennormalsubstanz" bedarf. Darüberhinaus lassen sich durch die histometrische Analyse weit mehr In-

formationen gewinnen als chemische oder physikalische Techniken sie vermitteln könnten. Insbesondere die Erhebungen über die Partikelzahl und -größe sowie deren Häufigkeitsverteilung bilden ein wichtiges Beurteilungskriterium für die Beschaffenheit des Erzeugnisses. Weiterhin kann die programmierte Auswertung der Daten Informationen über die Struktur des Probenkörpers und die Genauigkeit der Messung geben. Allein diese Vorteile rechtfertigen auch den Einsatz eines computer-gesteuerten Fernsehbildanalysators. Schließlich sei noch ein weiterer Punkt erwähnt, der auch für das mechanische Auszählen mit dem Point-Count-Gerät gilt: Die Probe bleibt bei der histometrischen Untersuchung unzerstört. Der Schnitt kann als Beweismaterial aufbewahrt und die Richtigkeit des Befundes jederzeit durch Kontrolluntersuchungen überprüft werden.

Die verschiedenen Analysenmethoden zum quantitativen Knochennachweis sollten wegen ihrer Gleichwertigkeit im Rahmen der amtlichen Untersuchung auch als gleichberechtigt anerkannt werden. Die praktische Erprobung wird später zeigen, welche Technik die günstigste Relation zwischen Präzision, Richtigkeit, Informationsgehalt und Kosten aufweist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung der Fernsehbildcomputeranalyse zur histometrischen Bestimmung des Knochengehaltes von Fleischerzeugnissen überprüft werden. Als Referenzmethoden dienten die Atomabsorptionsspektralphotometrie (AAS) und die Knochenaschebestimmung nach einem KOH-Verfahren. Sämtliche Analysen wurden in Form von Paralleluntersuchungen durchgeführt, wobei sich mit der Fernsehbildanalyse zusätzlich die Partikelzahl bestimmen und die mittlere Knochenteilchengröße errechnen ließen. Das Untersuchungsmaterial von insgesamt 51 Proben bestand aus reinem Separatorfleisch und daraus hergestellten Brühwurstzeugnissen.

Die Ergebnisse lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Die bisher in der Lebensmittelhistologie verwendeten Rezepturen zur Knochendarstellung eignen sich wegen ihres geringen "Grauwertkontrastes" nicht für die automatische Fernsehbildanalyse. Es wurde daher eine spezielle Färbetechnik entwickelt, bei der Knochenpartikel mit Silbernitrat imprägniert, in Kaliumpermanganat differenziert und abschließend mit einem Fotofixiermittel fixiert wurden. Nach Gegenfärben des übrigen Gewebes mit Orange G ergibt sich eine für die fernsehtechnische Knochenbestimmung ausreichende Helligkeitsdifferenz. Vor Beginn der Färbeprozedur wurden die aufgezogenen Schnitte mit einer Kollodiumlösung überschichtet, um die Haftung der Gewebspartikel auf dem Untergrund zu verbessern.
2. Mit der AAS und der KOH-Auskochmethode wurden für reines Separatorfleisch Knochengehalte zwischen 0,15 und 2,2 % bzw. 0,13 und 2,6 % ermittelt. Für die Fernsehbildanalyse lagen die Werte zwischen 0,14 und 4,9 %.

Bei separatorfleischhaltigen Brühwurstserzeugnissen ließen sich je nach Untersuchungsverfahren folgende Knochengehalte feststellen: AAS zwischen 0,002 und 0,56 %, KOH-Auskochverfahren zwischen 0,005 und 0,46 %, bei der Fernsehbildanalyse zwischen 0,01 und 0,69 %. Die aufgrund der fernsehtechnischen Auswertung errechneten mittleren Partikelgrößen lagen zwischen 42 und 3632 μm^2 , bei einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 7,6 bis 60 μm .

3. Die Ergebnisse der chemischen Knochenbestimmung mit der AAS und dem KOH-Auskochverfahren standen zu den histometrisch ermittelten Knochenanteilen (Vol. %) in einem Verhältnis von 1 : 1,8 bzw. 1 : 1,9.

Die lineare Regressionsanalyse zeigte eine enge Beziehung zwischen den verschiedenen Methoden. Im einzelnen ergaben sich: Histometrie und AAS: $y = -0,0727 + 2,0722x$, bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = .984$; Histometrie und KOH-Auskochverfahren: $y = -0,0063 + 2,044x$, $r = .971$; KOH-Auskochverfahren und AAS: $y = 0,0091 + 0,966x$, $r = .969$.

4. Die Ergebnisse der chemischen und histologischen Untersuchungen waren bei Knochengehalten über 0,1 % ohne Einschränkung miteinander vergleichbar. Sank der Knochenanteil dagegen unter diese Grenze, divergierten nicht nur die Analysenwerte zwischen den drei Verfahren, sondern auch innerhalb der jeweiligen Paralleluntersuchungen erheblich. Insbesondere bei der Fernsehbildanalyse verminderte sich die Meßgenauigkeit wegen des geringen Probenumfanges und der heterogenen Präparatstruktur. Die chemischen Untersuchungsverfahren wiesen in diesem Bereich eine bessere Übereinstimmung der Meßergebnisse auf, jedoch resultieren hier methodische Schwierigkeiten aus der großen Variationsbreite der Blindwerte und Umrechnungsfaktoren.

5. Die drei überprüften Verfahren zum quantitativen Knochennachweis können nach den vorliegenden Untersuchungen als gleichwertig angesehen werden.

SUMMARY

The following work assesses the suitability of television computer analysis for use as a histological measurement procedure to determine the bone content of meat products. The reference methods used were the atomic absorption spectrophotometer (AAS) and a KOH-extraction procedure whereby the bone ash content of the sample was determined. All of the experiments were conducted as parallel examinations and the television analysis yielded additional information concerning the number and the average size of the bone particles in the samples. The 51 samples examined were mechanically deboned meat and Frankfurter-type sausages containing mechanically deboned meat.

The results may be summarised as follows:

1. Until recently the histological techniques used to show the presence of bone material in foodstuffs were unsuitable for use with the television computer method because of the low level of contrast in the "grey value". A special staining method was developed in which the bone particles were impregnated with silver nitrate, differentiated with potassium permanganate and finally fixed with a photographic fixer. Sufficient contrast was achieved when the material was counter-stained with Orange G for the material to be assessed using the television computer. Prior to staining, the mounted sections were coated with collodium solution in order to secure the tissue more firmly to the slides.
2. Pure mechanically deboned meat was found to have a bone content of 0.15 - 2.2 % and 0.13 - 2.6 % using the AAS and KOH-extraction method respectively. Values of 0.14 - 4.9 % were obtained using the television analysis method. Frankfurter-type sausages containing

mechanically deboned meat yielded the following results according the method used: AAS between 0.002 and 0.56 %, KOH-extraction method between 0.005 and 0.46 %, television computer analysis between 0.01 and 0.69 %. The average particle size and diameter, as determined using the television computer method, were $42 - 3632 \mu m^2$ and $7.6 - 60 \mu m$ respectively.

3. The results obtained using the chemical procedures, (AAS and KOH-extraction method) as compared to those obtained histometrically, were found to be in a ratio of 1 : 1.8 and 1 : 1.9. The lineal regression analysis shows a close relationship between the different methods. The following results were obtained: histometric analysis and AAS: $y = -0.0727 + 2.0722x$, with a correlation coefficient of $r = .984$; histometric analysis and KOH-extraction methods: $y = -0.0063 + 2.044x$, $r = .971$; KOH-extraction methods and AAS: $y = 0.0091 + 0.966x$, $r = .969$.

4. The results obtained from the chemical and histological examination of samples containing over 0.1 % bone could be freely compared with one another. However, when the bone content fell below this level, not only was there a variation in the values obtained between the three methods but also there was considerable variation between the results of the parallel examinations. The small volume of the samples, together with the heterogenous nature of the preparation, reduced the accuracy of the measurements made using the television computer. The chemical methods used showed better agreement with each other than did the histological methods. However, other difficulties were encountered as a result of the large variation in the blank values and the conversion factors.

5. The three methods examined may be considered to have equal value in the quantitative determination of bone particles in meat products.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ANDERSON, J.R. und T.A. GILLET (1974)
Extractable-emulsifying capacity of hand and mechanically-deboned mutton.
J. Food Sci. 39, 1147
- ANHALT, G. (1974)
Der direkte und indirekte Nachweis von Knochensubstanz in Fleisch- und Wursterzeugnissen unter Berücksichtigung der maschinellen Entbeinung des Rohstoffes Fleisch.
Vet. med. Diss., Hannover
- ARNETH, W., H. LINKE, H. HECHT und K. HONIKEL (1975)
Technologisch unvermeidbarer Knochenanteil im Fleisch aus harten Separatoren.
12. Kulmbacher Woche, 1975. 13. - 16. 10. 1975
- ARNETH, W., H. LINKE, H. HECHT und K. HONIKEL (1976)
Technologisch unvermeidbarer Knochenanteil im Fleisch aus harten Separatoren.
SVZ schlachten und vermarkten 76, 426
- ARNETH, W. (1977)
Ein Verfahren zur halbautomatischen Calciumbestimmung in einem Probenhydrolysat.
Fleischwirtschaft 57, 100
- BACH, G. (1956)
Über die Größenverteilung von Kugelschnitten in durchsichtigen Schnitten endlicher Dicke.
Zschr. wiss. Mikrosk. 64, 265
- BAKER, R.C. (1974)
Zit. nach v. Wiese
Fleischwirtschaft 56, 606
- BAKER, R.C., J.M. DARFLER und S. ANGEL (1974)
Frankfurters made from mechanically deboned poultry meat (MDPM). 1. Effect of chopping time.
Poultry Sci. 53, 156
- BEM, Z. und L. LEISTNER (1974)
Fleischseparatoren aus mikrobiologischer Sicht.
Mttlq. Bl. d. BAF Kulmbach 46, 2244
- BENTLER, W. (1968)
Ein Beitrag zur Technik der histologischen Untersuchung von Rohwürsten.
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 33

BRÜNING-OELTJEN, A. (1977)

Vergleichende Untersuchungen handentbeinten Restfleisches von Schwein und Rind auf Knochengehalte unter Anwendung direkter und indirekter Verfahren.
Vet. med. Diss., Hannover

BUNDESANSTALT FÜR FLEISCHFORSCHUNG (1976)

Stellungnahme der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, zum Separatorfleisch.
Fleischwirtschaft 56, 912

CALLEJA, C. (1897)

Método de tripla coloracion con el carmin litinado y el picrocarmin.

Rev. trim. microgr. 2

Zit. Romeis (1968)

CHANT, J.L., L. DAY, R.A. FIELD, W.G. KRUGGEL und YET-OY CHANG (1977)

Composition and palability of mechanically deboned meat and mechanically separated tissue.

J. Food Sci. 42, 306

DEUTSCHER FLEISCHERVERBAND (1975)

Geschäftsbericht 1975, 36

DILLER, H. (1941)

Der Nachweis von kleinsten Knochenteilchen in Wurst.

Zschr. Untersuch. Lebensmitt. 82, 17

DUDLEY, R.P. (1975)

Zit. Tändler

Fleischwirtschaft 55, 1688

ELIAS, H. (1971)

Three-dimensional structure identified from single sections.

Science 174, 993

ERNST, H. (1974)

Zum histologischen Nachweis von Knochengewebe in fein zerkleinertem Fleisch.

Fleisch 28, 135

FIELD, R.A. und M.L. RILEY (1974)

Characteristics of meat from mechanically deboned lamb breasts.

J. Food Sci. 39, 851

FIELD, R.A., M.L. RILEY und M.H. CORBRIDGE (1974 a)

Influence of yield on calcium content of mechanically deboned lamb and mutton.

J. Food Sci. 39, 285

FIELD, R.A., M.L. RILEY, F.C. MELLO, M.H. CORBRIDGE
und A.W. KOTULA (1974 b)
Bone composition in cattle, pigs, sheep and poultry.
J. Anim. Sci. 39, 493

FIELD, R.A. (1976)
Mechanically-deboned red meat.
Food Technol. 30, 38

FIELD, R.A., S.L. OLSON-WOMACK und W.G. KRUGGEL (1977)
Characterization of bone particles from mechanically
deboned meat.
J. Food Sci. 42, 1406

FISCHERMEISTER, H.F. (1974)
Shape factors affecting quantitative microscopy.
Kernforschungszentrum Karlsruhe, externer Bericht, 6/76-4
Newsletter '74 in Stereology, S. 21

FRIED, I. (1976)
Regulatory considerations concerning mechanically-de-
boned red meat.
Food Technol. 30, 35

FRONING, G.W., R.G. ARNOLD, R.W. MANDIGO, C.E. NETH und
T.E. HARTUNG (1971)
Quality and storage stability of Frankfurters containing
15 % mechanically deboned turkey meat.
J. Food Sci. 36, 974

FRONING, G.W. (1976)
Mechanically-deboned poultry meat.
Food Technol. 30, 51

GAHM, J. (ohne Jahresangabe)
Handbuch für die visuelle Messung mit dem quantitativen
Fernsehmikroskop Micro-Videomat.
CARL ZEISS, 7082 Oberkochen, West Germany

GEND VAN, H.W. (1971)
Über die Bestimmung und den Gehalt von Knochensplittern
in Fleischwaren.
Zschr. Untersuch. Lebensmitt. 146, 97

GERATS, G.E und R.J. TERBIJHE (1975)
Der quantitative Nachweis von Knochenpartikeln in mecha-
nisch entbeintem Geflügelfleisch durch ein KOH-Verfahren.
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 230

GOODWIN, T.L. und J.E. WEBB (1968)
Chemical composition of mechanically deboned chicken.
Poultry Sci. 47, 1674

GRUNDEN, L.P. und J.H. MAC NEIL (1973)

Examination of bone content in mechanically deboned poultry meat by EDTA and atomic absorption spectro-photometric methods.

J. Food Sci. 38, 712

HADLOK, R. (1975)

Gewinnung und Verarbeitung maschinell entbeinten Restfleisches.

Fleischwirtschaft 55, 882

HECHT, H. (1973)

Untersuchungen über Spurenelemente im Fleisch.

Arch. Lebensmittelhyg. 24, 255

HECHT, H., A. MIRNA und P. SCHRAMMEL (1973)

Untersuchungen über den Gehalt an Spurenelementen in Schwein-, Rind- und Kalbfleisch.

Fleischwirtschaft 53, 237

HENNIG, A. (1956)

Bestimmung der Oberfläche beliebig geformter Körper mit besonderer Anwendung auf Körperhaufen im mikroskopischen Bereich.

Mikroskopie 11, 1

HENNIG, A. (1957 a)

Diskussion der Fehler bei der Volumenbestimmung mikroskopisch kleiner kugelförmiger Körper oder Hohlräume aus Schnittprojektionen.

Zschr. wiss. Mikrosk. 63, 67

HENNIG, A. (1957 b)

Fehler bei der Oberflächenbestimmung von Kernen bei endlicher Schnittdicke.

Mikroskopie 12, 7

HILDEBRANDT, G., H. WEIß und H. BERNER (1975)

Die Bedeutung nicht zu Skelettmuskulatur und Bindegewebssubstanz zählender Gewebe des Fleisches für die histometrische Qualitätsbeurteilung von Hackfleisch sowie Roh- und Brühwurst.

Fleischwirtschaft 55, 107

HILDEBRANDT, G., R. KÖNIGSMANN und F.J. KRETSCHMER (1977)

Die Eignung der Fernsehbild-Computer-Analyse zur histometrischen Kollagenbestimmung.

Fleischwirtschaft 57, 689

HILDEBRANDT, G. und R. KÖNIGSMANN (1977)

Quantitative Fernsehbildanalyse wertmindernder Gewebe in Fleischerzeugnissen.

7. Int. Symp. W.A.V.F.H., Garmisch-Partenkirchen 1977

- HOLMES, A.H. (1927)
Petrographic methods and calculations.
Verlag Murby & Co., London
- HUJNAKOVA, M. (1976)
Methods and means of evaluation of the content of bone particles in mechanically-deboned meat.
Zpravodaj Masneho Prumyslu No. 314, 46
Ref. FSTA 9, 10 S 1761
- KOSSA v. (1901)
Nachweis von Kalk.
Ziegl. Beitr. 29, 163
Zit. Romeis (1968)
- KOTTER, L. (1955)
Neue Wege bei der histologischen Wurstuntersuchung.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 68, 360
- KOTTER, L. (1964)
Zur Differenzierung der Proteine von Fleischwaren.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77, 433
- KOTTER, L. und O. PRÄNDL (1958)
Experimentelle Grundlagen für die Beurteilung des Kol-lagenvolumens von Brühwürsten.
Arch. Lebensmittelhyg. 9, 243
- KRAUSE, R. (1926)
Enzyklopädie der mikroskopischen Technik.
Bd. III
Verlag Urban & Schwarzenberg, Berlin-Wien
- KRESSMANN, H. (1968)
Vergleichende Untersuchungen an Knochenschrot und Fut-terfleischkonserven.
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 199
- KNORR, F., H. KERSKEN, K. POTTHAST und H. REUTER (1974)
Nachputzen von Schlachttierknochen. Versuche mit einem Walzenseparator.
Fleischwirtschaft 54, 899
- LANG, K. (1957)
Biochemie der Ernährung.
1. Auflage
Verlag Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt
- LAWRIE, R.A. (1966)
Meat Science.
1. Auflage
Pergamon Press Ltd., Oxford-London-New York

LENZ, F. (1955)

Zur Größenverteilung von Kugelschnitten.

Zschr. wiss. Mikrosk. 63, 50

LIENHOP, E. (1960)

Ein Beitrag zur Frage der Qualitätsprüfung von Rohwurst mit Hilfe vergleichender histologischer und chemischer Methoden.

Arch. Lebensmittelhyg. 11, 54

LINKE, H. (1971)

Die Bedeutung herstellungsbedingter Schwankungen für die Qualitätsbeurteilung von Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtschaft 51, 1506

LINKE, H. (1974)

Fleischseparatoren aus lebensmittelrechtlicher Sicht.

Mttlg. Bl. d. BAF Kulmbach 46, 2253

LINKE, H. und O. FLEISCHMANN (1964)

Zum Bindegewebsgehalt in zerkleinertem, erhitztem Hühnerfleisch.

Fleischwirtschaft 44, 866

LINKE, H. und W. THUMSER (1964)

Zur Beurteilung von Knochen und Knorpel in Roh- und Brühwürsten.

Arch. Lebensmittelhyg. 15, 201

LINKE, H., W. ARNETH und Z. BEM (1974)

Ein neues Verfahren zur mechanisierten Restfleischgewinnung unter hygienischen, analytischen und lebensmittelrechtlichen Gesichtspunkten.

Fleischwirtschaft 54, 1653

MERKEL, R.A. (1970)

Inorganic constituents.

In "The Science of Meat and Meat Products", S. 165

Herausgeber J.F. Price und B.S. Schweigert (1971)

Verlag W.H. Freeman and Company, San Francisco

NEUHÄUSER, S. (1977)

Technologische Verbesserungen der maschinellen Fleischgewinnung.

Fleischwirtschaft 57, 1233

NOBLE, J. (1974)

Das Zeitalter der vollkommenen Fleischausbeute.

Fleischerei 25, Heft 10, 30

N. N. (1976 a)

Deboning New Notes.

Offers data on 5 red meat deboners.

Food Technol. 30, 74

N. N. (1976 b)

Deboning New Notes.

Extrudes meat, compress bones.

Food Technol. 30, 74

N. N. (1976 c)

Deboning New Notes.

Designed to debone hand-deboned bones.

Food Technol. 30, 76

OELKER, P. (1972)

Zur enzymatischen Entfleischung von Knochen.

Fleisch 26, 233

OSTOVAR, K., J.H. MAC NEIL und K. O'DONELL (1971)

Poultry Product Quality. 5. Microbiological evaluation of mechanically deboned poultry meat.

J. Food Sci. 36, 1005

PERKIN ELMER (1974)

Analytische Methoden der Atomabsorptions-Spectrophotometrie.

Analyse von Nahrungsmitteln.

Perkin Elmer Company, Norwalk, Conn.

PFAFF, W. (1974)

Die Definition "Aufgeschlossenes Milcheiweiß" im Wandel der Fleischverordnungen.

Fleischwirtschaft 54, 46

PFEIFFER, G. (1975)

Einige experimentell interessante Erfahrungen bei der Entwicklung eines Verfahrens zur mechanischen Gewinnung des Restfleisches von sogenannten Fleischknochen.

Fleischwirtschaft 55, 905

PFEIFFER, G. (1976)

" Abfallstoffe für die Brühwurst "? Erwiderung auf einen Artikel " Abfallstoffe für die Brühwurst " in der Frankfurter Allgemeinen Zeitung vom 13. März 1976.

Fleischwirtschaft 56, 484

PFEIFFER, G., R. WELHÄUSER und H. GEHRA (1975)

Eine Trichromfärbung zur Darstellung von Muskeleiweiß, Bindegewebsweiß und mineralisch behaftetem Knochengewebe.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 191

PRÄNDL, O. (1961)

Die histologische Analyse von Wurstwaren. Grundlagen für die quantitative Auswertung histologischer Präparate.

Gerhard Röttger Verlag, München

PROST, E., E. PELCZYNSKA und A.W. KOTULA (1975)

Quality characteristics of bovine meat. I. Content of connective tissue in relations to individual muscles, age and sex of animals and carcass quality grade.

J. Animal Sci. 41 (2), 534

REUTER, H. (1977)

IFFA 77 - Wer bietet was an?

Maschinelle Restfleischgewinnung.

Fleischwirtschaft 57, 586

ROMEIS, B. (1968)

Mikroskopische Technik.

16. Auflage

R. Oldenbourg Verlag, München-Wien

Rd. Erl. d. RMdI

Betr. die Ein- und Durchfuhr von Knochenmehl und ähnlichen Erzeugnissen sowie Knochen vom 17. 6. 1942.

(M. Bl. 1. V. S. 1331; Veröff. VIII S. 132) Anlage 2, Ziff. IV

SACHS, L. (1968)

Statistische Auswertungsmethoden.

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

SATTERLEE, L.D., G.W. FRONING und D.M. JANKY (1971)

Influence of skin content on composition of mechanically deboned poultry meat.

J. Food Sci. 36, 979

SCHAAL, M. und G. ANHALT (1974)

Nachweis von Knochenpartikeln in Wursterzeugnissen.

Arch. Lebensmittelhyg. 25, 164

SCHNELL, P.G., K.R. NATH, J.M. DARFLER, D.V. VADEHRA und R.C. BAKER (1973)

Physical and functional properties of mechanically deboned poultry meat as used in the manufacture of Frankfurters.

Poultry Sci. 52, 1363

SCHNELL, P.G., D.V. VADEHRA, L.R. HOOD und R.C. BAKER (1974)

Ultrastructure of mechanically deboned poultry meat.

Poultry Sci. 53, 416

- SCHORMÜLLER, J. (1974)
Lehrbuch der Lebensmittelchemie.
2. Auflage
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
- SCHULZE, K. (1977)
Bestimmung des Knochengehaltes in Separatorfleisch aus
Schweineknochen.
Arch. Lebensmittelhyg. 28, 166
- SINELL, H.-J. (1956 a)
Zum quantitativen Nachweis geringer Knochenmengen in
Dosenleberwurst.
Arch. Lebensmittelhyg. 7, 61
- SINELL, H.-J. (1956 b)
Polarisationsmikroskopische Untersuchungen in der Wurst-
histologie.
Arch. Lebensmittelhyg. 7, 155
- SKRYPNIK, A. (1961)
Lösen des Fleisches von den Knochen durch Abpressen.
Mjasnaja industrija 32, 2, 8
Ref. Heinz (1967)
Fleischwirtschaft 47, 1092
- SOMMER, H. und U. MÜLDER (1975)
Eine Methode zur Bestimmung von Knochenteilchen in
Würsterzeugnissen aus Separatorfleisch.
Fleischwirtschaft 55, 1730
- TÄNDLER, K. (1974)
Fleischseparatoren aus technologischer Sicht.
Mttlg. Bl. d. BAF Kulmbach 46, 2242
- TÄNDLER, K. (1975 a)
Gewinnung und Verarbeitung von Separatorenfleisch von
Rinder- und Schweineknochen.
Jahresbericht der BAF Kulmbach 1975, C 19
- TÄNDLER, K. (1975 b)
USDA-Spezifikationen für "Separatorfleisch" von Rinder-
und Schweineknochen.
Fleischwirtschaft 55, 1688
- TÄNDLER, K. (1977)
Fleisch in den USA: Wirtschaft-Forschung-Überwachung.
Anlagen zur Restfleischgewinnung von Rinder- und Schweine-
knochen.
Fleischwirtschaft 57, 336

THIEMIG, F. (1972)

Entbeinung des Fleisches durch mechanische Verfahren.
Fleisch 26, 185

WELZ, B. (1972)

Grundlagen und Leistungsfähigkeit der Atom-Absorptions-Spektroskopie.

CZ-Chemie-Tech. 1, 373

WENZEL, S., G. ANHALT, M. SCHAAL und H. FROEHNER (1974)

Vergleichende Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Knochengewebe in Fleisch- und Wursterzeugnissen durch direkte und indirekte Verfahren.
Arch. Lebensmittelhyg. 25, 173

WIESE v., W. (1976)

Zur Versachlichung der Diskussion über manuellen Knochenputz sowie maschinell entbeintes Fleisch von Geflügel und Großtieren.

Fleischwirtschaft 56, 606

WINTER, F.F. (1977)

Standardisierung, Separierung und Behandlung von Fleisch.
Fleischerei 28, Heft 5, 41

WIRTH, F. (1973)

Enzymatische Trennung von Fleisch und Knochen.

Mitteilungsblatt der Förderergesellschaft der BAF, Nr. 39

WIRTH, F. (1974)

Beobachtungen auf der IFFA 74. Bewährtes und Neues.
Fleischwirtschaft 54, 1135

WITTMANN, M. (1977)

Zur maschinellen Trennung von Fleisch und Knochen.

Fleischwirtschaft 57, 1135-1143 und 1261-1274

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Hans-Jürgen Sinell für die Überlassung des Themas und die Beratung herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Götz Hildebrandt für die jederzeit gewährte Beratung und Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Fachrichtung Lebensmittelhygiene, besonders Fr. Jutta Schuldig, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Herrn Hans Berner, ehemals Fachrichtung Biometrie des Fachbereiches Veterinärmedizin, danke ich für die Erstellung des Computerprogrammes und Herrn Professor Hartmut Weiß, Fachrichtung Biometrie, für die statistische Beratung.

Ferner möchte ich mich beim Institut für Tierzucht und Tierernährung des Fachbereiches Veterinärmedizin bedanken, speziell bei Fr. Eisold, die mir die Messungen mit dem Atomabsorptionsspektralphotometer ermöglicht haben.

L E B E N S L A U F

- | | |
|------------------------------------|--|
| 22.10.1949 | als vierter Sohn des Tischlermeisters Anton Königsmann und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Koschan, in Berlin-Spandau geboren |
| April 1956 | Einschulung in die Südpark-Grundschule in Berlin-Spandau |
| April 1962 | Umschulung in den naturwissenschaftlichen Zweig der Freiherr-vom-Stein Oberschule in Berlin-Spandau |
| Februar 1969 | Abitur |
| Sommersemester 1969 | Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin |
| März 1971 | Physikum |
| Juli 1974 | Tierärztliche Prüfung |
| August 1974 | Approbation als Tierarzt |
| September 1974 bis
Februar 1975 | Wiss. Angestellter in der Fachrichtung Biometrie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin |
| März 1975 bis
Mai 1975 | Wiss. Angestellter am Institut für Lebensmittelhygiene, Fleischhygiene und -technologie, Fachrichtung Lebensmittelhygiene des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin |
| Seit 1.6.1975 | wissenschaftlicher Teilzeitassistent in derselben Fachrichtung |

DISSERTATIONS-DRUCK WALTER MONATH
Wichurastr. 58c Tel. 030/7754776/77 1 Berlin 46